



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de genes de virulencia en
Streptococcus agalactiae de aislados clínicos de dos
instituciones de salud, Lima, Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Angie PULIDO COLINA

ASESOR

Dr. Víctor CRISPÍN PÉREZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pulido A. Caracterización molecular de genes de virulencia en *Streptococcus agalactiae* de aislados clínicos de dos instituciones de salud, Lima, Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2020.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-7619-4353
DNI o pasaporte del autor	46086538
Código ORCID del asesor	0000-0003-3863-2698
DNI o pasaporte del asesor	07363013
Grupo de investigación	“__”
Agencia financiadora	“__”
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. José Santos Chocano 199, Bellavista 15081, Perú. Coordenadas geográficas: Latitud: -12.0543106 Longitud: -77.0890684
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019
Disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Biología celular, Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las **11:00 hrs. del 10 de diciembre de 2020** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. María Elena Salazar Salvatierra e integrado por los siguientes miembros: Dr. Víctor Crispín Pérez (Asesor), Dra. Mirtha Roque Alcarraz y Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES DE VIRULENCIA EN *Streptococcus agalactiae* DE AISLADOS CLÍNICOS DE DOS INSTITUCIONES DE SALUD, LIMA, PERÚ"**, presentado por la Bachiller en Tecnología Médica **ANGIE PULIDO COLINA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) – Muy bueno

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Tecnología Médica **ANGIE PULIDO COLINA**, el Grado Académico de Magister en **Microbiología**.

Siendo las **12:20** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **12:25** hrs. del 10 de diciembre de 2020.

.....
Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Presidenta

.....
Dr. Víctor Crispín Pérez (P. P., T.P.)
Miembro - Asesor

.....
Dra. Mirtha Roque Alcarraz (P. P., D.E.)
Miembro

.....
Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc, T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria

A mis padres Rubén y Doris por su enorme amor y apoyo en todo lo que me propuse, y por enseñarme los valores de la responsabilidad, respeto y gratitud.

A mi esposo Edgar por sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por la motivación constante para cumplir mis objetivos.

Agradecimientos

A Dios por la vida, la salud y por iluminar mi camino con la luz del conocimiento; y por todas las oportunidades que me brinda en la vida.

A mis padres y hermanos por su inmenso amor y fuente de inspiración para ser una mejor persona, hija y hermana cada día. Especialmente a mis padres quienes me apoyaron enormemente cuando estuve con yeso y me llevaban a la Universidad para poder rendir exámenes y pasaban por mí cuando salía muy tarde de clases, o me esperaban en casa para cenar, siempre muy pendientes de mí.

A mi esposo por su amor, paciencia y comprensión. Porque durante esta cuarentena día tras día no me dejó distraerme hasta no culminar con este gran pendiente que tenía y por motivarme a seguir investigando con pasión y dedicación. Un gran apoyo en mi desarrollo personal y profesional.

Al Lic. Javier Soto Pastrana mi especial reconocimiento por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, apoyando el desarrollo de mi tesis. Y por permitirme ingresar al laboratorio de microbiología del Hospital San Bartolomé y realizar parte de esta investigación.

Al Dr. Víctor Crispín Pérez por ser mi maestro y asesor, por sus enseñanzas y apoyo continuo en el desarrollo de mi tesis, y sobre todo haber estado siempre incentivándome a culminarla.

A los miembros del Jurado evaluador y calificador Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Dra. Mirtha Roque Alcarraz y Mg. Julio Ruiz Quiroz, por su valioso tiempo y dedicación profesional a pesar de encontrarnos en tiempos difíciles por la pandemia. Y por su invaluable aporte académico, revisión y valiosas sugerencias que permitieron la mejora de esta tesis.

A la profesora Esther Valencia Bazalar por permitirme trabajar en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical - UNMSM, por su apoyo para desarrollar una parte de mi tesis, sus sabias enseñanzas y consejos.

A Milagros Zavaleta por permitirme trabajar en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical - UNMSM y por haberme permitido ingresar a los laboratorios para la realización de la parte experimental de la tesis.

Laura por sus enseñanzas de bioinformática, a Rocío y Katy por su paciencia en enseñarme las técnicas de biología molecular, por la confianza depositada en mí desde el inicio.

A Lizet Lezameta por la amistad y los años de trabajo juntas en la clínica.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM por permitirme alcanza este logro importante en mi carrera profesional, a los profesores de la Maestría, por su generosidad en compartir sus conocimientos y experiencias, y a mis compañeras de la maestría en especial a Carmencita, Anita, Liz, Mili y Yani con quienes compartí muchas experiencias, por su apoyo cuando estuve mal y aunque hayan pasado los años seguimos con nuestra amistad.

Ahora puedo por fin decir lo logré. Logré culminar aquello que inicié en el 2014 y a pesar que este año ha sido complicado, me permitió sentarme y concentrarme en terminar de redactar la tesis y finalmente sustentarla.

A la Dra. Margarita Laczeski por responder a mis correos a pesar de no conocerme y brindarme su apoyo con el protocolo de trabajo y los "primers" de los genes de virulencia.

Finalmente, gracias a todos los que son parte de la culminación de este trabajo los que mencione y los que no.

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
 I. INTRODUCCIÓN	 1
1.1. Formulación del Problema	2
1.2. Objetivo general	2
1.3. Objetivos específicos	2
 II. MARCO TEÓRICO	 3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos teóricos	6
2.2.1. Estreptococos	6
2.2.2. Streptococcus agalactiae	8
a. Antecedentes históricos	8
b. Fisiología y estructura	9
c. Clasificación y Tipificación	10
d. Hábitat	12
e. Factores de virulencia	12
f. Manifestaciones clínicas	17
g. Epidemiología	19
h. Terapia antibiótica	22

i. Marco Conceptual.....	25
III. MÉTODOLOGÍA.....	26
3.1. Tipo de investigación	26
3.2. Consideraciones éticas.....	26
3.3. Unidad de análisis.....	26
3.4. Muestra.....	26
3.5. Tamaño de muestra.....	26
3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos.....	26
3.6.1. Recuperación de los aislados y confirmación de la identificación:	27
3.6.2. Detección fenotípica de la resistencia:	27
3.6.3. Detección genotípica de factores de virulencia mediante PCR simple:.....	27
3.6.4. Obtención de ADN total:	27
3.6.5. Detección de genes de virulencia <i>lmb</i> , <i>bca</i> y <i>rib</i> :	27
3.6.6. Electroforesis:	29
3.7. Procesamiento de la información o de datos	29
3.8. Variables.....	30
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
VIII. ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de estreptococos de importancia médica.....	7
Tabla 2. Factores de virulencia del EGB	17
Tabla 3. Fenotipos de resistencia a antibióticos MLSb que se pueden detectar en <i>Streptococcus</i> y posibles mecanismos asociados	24
Tabla 4. Secuencia de cebadores utilizados para amplificar los genes de virulencia en EGB	28
Tabla 5. Mezcla de reacción	28
Tabla 6. Detalle del ciclado de la PCR para la amplificación de los genes de virulencia en EGB	29
Tabla 7. Presencia de genes de virulencia en los aislados de EGB	32

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Patrones hemolíticos de los <i>Streptococcus</i> spp	8
Ilustración 2. Estructura del <i>Streptococcus agalactiae</i>	11
Ilustración 3. Estructura del carbohidrato del grupo B	11
Ilustración 4. Principales adhesinas que median la interacción de <i>Streptococcus agalactiae</i> con células huésped	13
Ilustración 5. Prueba de CAMP	31
Ilustración 6. Frecuencia de los genes de virulencia por tipo de muestra en los aislados de EGB	32
Ilustración 7. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>lmb</i> (300pb) en los aislados de EGB.	33
Ilustración 8. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>bca</i> (184pb) en los aislados de EGB.	33
Ilustración 9. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen <i>rib</i> (369pb) en los aislados de EGB.	34
Ilustración 10. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en los aislados de EGB	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- EGB:** *Streptococcus agalactiae* o Estreptococo del grupo B
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase chain reaction”)
- RN:** recién nacidos
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PE:** penicilina
- ERI:** eritromicina
- CLI:** clindamicina
- LEV:** levofloxacino
- BA:** bacitracina 0,04 U
- PYR:** L-pirrolidonil- β - naftilamida
- VP:** prueba de Vogues-Proskauer
- CAMP:** prueba de Christie, Atkins y Munch-Petersen
- PC:** polisacárido capsular
- MEC:** matriz extracelular
- IITem:** infección de inicio temprano
- IITar:** infección de inicio tardío
- PAI:** profilaxis antibiótica intraparto
- CDC:** Centers for Disease Control and Prevention
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- MLSb:** macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B
- TSA:** Agar Trypticase de Soja
- SV:** Secreción vaginal
- WHONET:** World Health Organization Net
- Pb:** pares de bases

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización molecular de los genes de virulencia de *Streptococcus agalactiae* (EGB) de aislados clínicos de dos instituciones de salud, Lima, Perú. Se realizó un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” y en una clínica privada, entre enero de 2019 y abril de 2019. Se colectaron 31 aislados clínicos de EGB. La identificación y susceptibilidad antimicrobiana fue realizada con el equipo Vitek 2 Compact (BioMérieux); y los genes de virulencia *lmb*, *rib* y *bca* se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers específicos. De los 31 aislados, 22/31 (71%) se obtuvieron de muestras de orina y 9/31 (29%) de secreción vaginal. El análisis por PCR reveló que el gen de virulencia *lmb* fue detectado en 23/31 (74,2%), el gen *bca* en 19/31 (61,3%) y el gen *rib* en 8/31 (25,8%). También se detectó que 21/31 (67%) de los aislados tuvieron más de un gen de virulencia: *lmb-bca* 14/31 (45,2%) y *rib-lmb* 7/31 (22,6%). El perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos mostró que el 100% de estos fueron sensibles a penicilina, ampicilina y vancomicina, mientras que a eritromicina, clindamicina y levofloxacino fueron resistentes el 48,4%; 54,8% y 19,4% respectivamente. En conclusión, el gen *lmb* fue el más frecuente y el 67,7% de los aislados presentó más de un gen de virulencia. Además, se observó altos niveles de resistencia a eritromicina y clindamicina.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, factores de virulencia, *lmb*, *rib*, *bca*, Perú.

ABSTRACT

The objective of this study was to perform the molecular characterization of the virulence genes of *Streptococcus agalactiae* (GBS) from clinical isolates from two health institutions, Lima, Peru. An observational, descriptive and cross-sectional study was carried out at the Mother Child National Hospital “San Bartolomé” and in a private clinic, between January 2019 and April 2019. 31 clinical GBS isolates were collected. Identification and antimicrobial susceptibility were performed in the Vitek 2 Compact automated system (BioMérieux); and the *lmb*, *rib* and *bca* virulence genes were determined by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Of the 31 isolates, 71% (22/31) were obtained from urine samples and 29% (9/31) from vaginal secretion. PCR analysis revealed that the *lmb* virulence gene was detected in 23/31 (74.2%), the *bca* gene in 19/31 (61.3%) and the *rib* gene in 8/31 (25.8%) 21/31 (67%) of the isolates that had more than one virulence gene were also detected: *lmb-bca* 14/31 (45.2%) and *rib-lmb* 7/31 (22.6%). The antimicrobial susceptibility profile showed that 100% of these were sensitive to penicillin, ampicillin and vancomycin, while erythromycin, clindamycin and levofloxacin were resistant 48.4%; 54.8% and 19.4% respectively. In conclusion, the *lmb* gene was the most frequent and 67.7% of the isolates presented more than one virulence gene. In addition, high levels of resistance to erythromycin and clindamycin were observed.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, virulence factors, *lmb*, *rib*, *bca*, Perú.

I. INTRODUCCIÓN

Streptococcus agalactiae o Estreptococo del grupo B (EGB), es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, negativo a las pruebas de oxidasa y catalasa, aunque tiene características nutricionales exigentes puede crecer en medios de cultivo simple; sin embargo, en aquellos medios suplementados con sangre mejora el crecimiento e identificación (1).

Es parte de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal, desde donde puede colonizar el tracto genital, adquiriendo relevancia en embarazadas a término. Los recién nacidos (RN) se colonizan durante el proceso del parto, desde el tracto genital materno que se encuentra colonizado o dentro del útero tras la ruptura de membranas o, con menor frecuencia, a través de la vía ascendente, a pesar de la integridad de las membranas, siendo la tasa de transmisión vertical del 50%, causando meningitis, neumonía y sepsis entre los principales cuadros (2).

En el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que cada año se producen un millón de muertes neonatales a causa de una infección neonatal, y se cree que un número igual de muertes fetales son causadas por infecciones. EGB es la principal causa de infecciones neonatales y un importante participante de las muertes fetales (3).

Si bien la patogenia de EGB se ha asociado mayormente a casos de gestantes y puérperas, en la última década se ha reconocido como un patógeno oportunista provocando enfermedad en adultos con patologías de base, sobre todo los casos invasivos, al igual que en adultos no gestantes sin patologías de base, siendo frecuentes infecciones de tracto urinario, con bacteriurias asintomáticas, cistitis, pielonefritis, uretritis, entre otros (4).

Es de gran importancia conocer los factores de virulencia de EGB, para la comprensión de la patogénesis y la epidemiología de la infección; tanto por la morbi-mortalidad que origina como para las secuelas que pueden dejar como consecuencia de la sepsis, meningitis y neumonía, ya sea en RN o en mujeres gestantes y adultos mayores.

En nuestro país pocos estudios han abordado este tema a pesar de su importancia en la salud pública. Conocer la frecuencia de estos genes de virulencia en EGB, hace necesaria esta investigación, que permitirá conocer la epidemiología molecular actual de estos mecanismos de virulencia presentes en EGB y así tener una mayor comprensión de la patogénesis.

Así mismo, se ha descrito que EGB presenta una sensibilidad del 100% a penicilina (PE), siendo este el más utilizado como tratamiento profiláctico en mujeres embarazadas. No obstante, se estima que un 10-12% de las embarazadas podrían presentar algún grado de alergia a PE, lo cual es una problemática que se puede solucionar con el uso de lincosamidas o macrólidos. Sin embargo, se ha evidenciado un aumento significativo de la resistencia a estos antibióticos, lo cual hace necesario también el estudio del perfil de susceptibilidad de EGB frente a estos antibióticos (5).

1.1. Formulación del Problema

Problema general:

¿Cuáles son los genes de virulencia de EGB de aislados clínicos de dos instituciones de salud, Lima, Perú?

Problemas específicos:

- ¿Cuál es la frecuencia de los genes de virulencia en EGB de aislados clínicos?
- ¿Cuál es la frecuencia de los genes de virulencia en EGB según tipo de muestra?
- ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en EGB de aislados clínicos?

1.2. Objetivo general

Realizar la caracterización molecular de genes de virulencia de EGB de aislados clínicos de dos instituciones de salud, Lima, Perú.

1.3. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de genes de virulencia en EGB de aislados clínicos.
- Determinar la frecuencia de genes de virulencia en EGB según tipo de muestra.
- Determinar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en EGB de aislados clínicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En el Perú, Tamariz et al. (2004), realizaron un estudio a 238 gestantes obteniendo muestras de hisopado vaginal y ano-rectal. Aislaron EGB en 10,9% de las pacientes estudiadas, donde el 36,4% indicaron haber tenido abortos previos. Los aislados presentaron una resistencia a eritromicina (ERI) de 11,5%. Los investigadores concluyeron que sus resultados mostraban la necesidad de realizar estudios sobre los niveles de colonización e infección en neonatos y gestantes por EGB por falta de información en el país (6).

Rubio M y Sánchez G (2016), en su investigación analizaron muestras de hisopado vaginal y ano-rectal a un total de 53 gestantes atendidas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia en Lima, entre enero y mayo de 2016 obteniendo una positividad de 17% para EGB. Concluyeron que el porcentaje de colonización por EGB es considerable e indican un aumento en la tasa de crecimiento a través de los años, por lo que es recomendable implementar en los centros de salud los protocolos de prevención para este patógeno (7).

Nauto E (2019), en su estudio realizado en el Instituto Nacional Materno Perinatal en Lima, entre febrero y julio de 2017, analizó muestras de hisopado vaginal y ano-rectal a un total de 130 gestantes, aislando EGB en el 23,1% de las pacientes. Concluyendo que la prevalencia de la colonización por EGB en su estudio es superior a la esperada en América Latina y se asocia a la edad materna, número de gestación y nivel de instrucción (8).

A nivel internacional, Manning et al. (2006) explica que las proteínas Rib, alfa y beta C codificadas por los genes *rib*, *bca* y *bac* respectivamente, desencadenan la producción de anticuerpos que ofrecen protección contra la infección por EGB en modelos animales, pero desconocen la frecuencia de estos genes en cepas de EGB invasivas versus colonizadoras, por tal motivo evaluaron 162 cepas invasivas y 338 cepas colonizantes de EGB, de diferentes muestras clínicas. Entre los genes de virulencia que se estudiaron, se produjeron frecuencias similares entre cepas invasoras y colonizadoras para gen *bac* (20% versus 23%) y gen *rib* (28% versus 20%), mientras que el gen *bca* se encontró con más frecuencia en cepas colonizadoras (46%) versus invasivas (29%). Concluyen que se deben identificar otros factores de virulencia para comprender mejor la enfermedad de EGB. Los aislados evaluados

pueden contener otras características de virulencia, ya que la virulencia del EGB es probablemente atribuible a múltiples genes (9).

Hannoun et al. (2009), estudiaron genes de virulencia en 76 aislados de EGB de muestras vaginales, el gen *cyle* estaba presente en 99% de los aislados, el gen *lmb* en el 96%, *scpB* en 94,7%, *rib* en 33%, y *bca* en 56,5% de los aislados. Determinaron la presencia de 7 serotipos. Fueron resistentes a ERI en el 11,8% y a clindamicina (CLI) en 15,8% de los aislados. Finalmente los genotipos se correlacionaron con algunos de los genes de virulencia y los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos, información útil para identificar cepas particulares de EGB con alto potencial de virulencia, con resistencia a los agentes antimicrobianos. Otra observación es que los genes *bca* y *rib* no estaban presentes concomitantemente en el mismo genoma (10).

Keil et al. (2010), evidenciaron la presencia del gen *rib* en el 87,8 % (36/41) de los aislados, no encontraron diferencias significativas en la frecuencia del gen *rib* en cepas colonizantes respecto a las invasivas ($p > 0.05$). Esto podría deberse a la presencia de otros genes involucrados en la virulencia, ya que esta ha sido asociada a la expresión de múltiples genes (11).

Oviedo et al. (2013), estudiaron hisopados vaginal y rectal de 3125 mujeres embarazadas entre 2004 - 2010 en Misiones, Argentina, evidenciándose una colonización materna de 9,38%. Los genes de virulencia *lmb*, *bca*, *hylB* y *rib* fueron detectados en 94,3%, 88,6%, 79,5% y 76,1% de las cepas respectivamente. Concluyeron que la distribución del serotipo, los genes que codifican los supuestos factores de virulencia y los patrones de fenotipos de resistencia de EGB pueden variar en diferentes áreas. Por lo tanto, deben evaluarse en cada lugar para diseñar estrategias de prevención (12).

Dutra et al. (2014), observaron que, de 434 aislados todos fueron sensibles a los antimicrobianos betalactámicos, presentaron resistencia a ERI y CLI en 4,1% y 3% de los aislados respectivamente y detectaron los genes *lmb* y *scpB* en todos los aislados, mientras que *bac* y *bca* se detectaron en 57 (13,1%) y 237 (54,6%) aislados, respectivamente. Con los hallazgos sugieren que los aislados de EGB que circulan en Brasil tienen una amplia diversidad fenotípica y genotípica y que los aislados resistentes a macrólidos pueden surgir tanto por la propagación clonal como por la adquisición independiente de genes de resistencia (13).

Laczeski et al. (2014), realizaron un estudio entre 2004 - 2011 en Misiones, Argentina, a partir de hisopado ano-rectal y vaginal en mujeres gestantes durante el último trimestre; donde 14/197 cepas de EGB presentaron el serotipo V y los genes *bca* y *hylB*; además, determinaron la presencia de genes *lmb* en 78,6% (11/14), *rib* en 64,3% (9/14), *bac* en 42,8% (6/14) de los aislados. También en 11 de las 14 cepas se detectaron 4 o más genes asociados a la virulencia, lo que confiere a este una elevada probabilidad de patogenicidad. Concluyeron que la frecuencia elevada de genes asociados a la virulencia y la resistencia a macrólidos detectada en este estudio de EGB serotipo V, alienta a reforzar las estrategias de vigilancia epidemiológica de estas cepas (14).

Laczeski et al. (2014), analizaron 200 cepas de EGB de las cuales 5,5% eran del serotipo IX. Se detectó los genes *bac*, *bca* y *hylB* en 63,6% de las cepas, y los genes *lmb* y *rib* en el 54,5%. Concluyeron que los aislados estudiados se encontraron sólo en cepas colonizadoras y no presentaron resistencia a ERI y CLI (15).

Eskandarian et al. (2015), recolectaron 103 cepas de EGB en un hospital de Malasia (junio 2010-octubre 2011), siendo 22 cepas invasivas, 21 no invasivas y 60 colonizadoras. Determinaron genes de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), mostrando la presencia de los genes *cyle*, *lmb*, *scpB* y *hylB* en casi todos los aislados, también se encontraron los genes *rib* (29,1%), *bca* (14,6%) y *bac* (9,7%). Las tasas de resistencia a ERI y CLI fueron 23,3% y 17,5% respectivamente. Concluyeron que existe una relación entre los genes de virulencia y los serotipos, pero no confirmaron la contribución de virulencia sobre estos (16).

Jalalifar et al. (2019), analizaron 100 aislados de EGB procedentes de muestras de orina de pacientes con infección urinaria, donde determinaron la frecuencia de los genes de virulencia: *rib* (40%), *bca* (22%); además el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos mostró resistencia a ERI (52%), CLI (47%) y levofloxacino (LEV) (9%). Se observó una relación significativa entre serotipos y genes de virulencia, así como la sensibilidad reducida a los antibióticos, por lo que recomiendan el desempeño de los programas de vigilancia con antibióticos (17).

Wu et al. (2019) realizó un estudio en un hospital universitario en China (2008-2015), analizando 99 aislados de EGB recuperados de neonatos y mujeres embarazadas. En la identificación de los factores de virulencia el gen *hylB* se detectó en todos los aislados. Los

genes *lmb*, *scpB*, *bac* y *bca* representaron el 94,9%, 87,9%, 14% y 6% de todos los aislados, respectivamente. Se detectaron altas tasas de resistencia a ERI mayores a 66,7%. Concluyeron que se necesita con urgencia un estudio observacional prospectivo nacional para investigar (18).

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Estreptococos

El género *Streptococcus* es un grupo de microorganismos gram positivos de forma esférica u ovoide de aproximadamente 1µm, inmóviles y no forman esporas. Son bacterias lácticas homofermentativas que generan ácido láctico, sin formación de gas y anaerobios facultativos (19). Son nutricionalmente exigentes, necesitando medios enriquecidos con sangre, además de la presencia de un 5% de CO₂, siendo otras anaerobias estrictas. La temperatura ideal de desarrollo es de 35°C; son catalasa negativo, a diferencia de las especies del género *Staphylococcus* (1).

La diferencia de especies de este género es complicada, debido a que se utilizan los tres sistemas diferentes enumerados a continuación:

1. Especificidad serológica (antígenos de pared celular o capsulares): Rebecca Lancefield, en 1930, estableció el sistema de agrupación de Lancefield para los estreptococos beta-hemolíticos. Los antígenos detectados por el sistema de agrupación de Lancefield son polisacáridos de pared celular y son el origen de esta clasificación (A - H y K - U). Esta especificidad de grupo se da por un aminoglúcido del hidrato de carbono específico. Tal como lo menciona Brooks “en el grupo A: ramnosa-N-acetilglucosamina; en el grupo B: ramnosa-glucosamina; en el grupo C: ramnosa-N-acetilgalactosamina; en el grupo D: ácido teicoico de glicerol que contiene D-alanina y glucosa; y en el grupo F: glucopiranosil-N-acetilgalactosamina”. Además, los polisacáridos capsulares se usan para tipificar *Streptococcus pneumoniae* y EGB (19).

Los grupos A, B, C, F y G cursan con infecciones en el ser humano, como podemos observar en la tabla 1.

Tabla 1. Características de estreptococos de importancia médica (19)

Nombre	Sustancia específica de grupo ^a	Hemólisis ^b	Hábitat	Criterios de laboratorio importantes	Enfermedades frecuentes e importantes
<i>Streptococcus pyogenes</i>	A	β	Faringe, piel	Colonias grandes (>0.5 mm), positividad en la prueba con PYR, ^c inhibido por bacitracina	Faringitis, impétigo, fiebre reumática, glomerulonefritis, choque tóxico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	B	β	Aparato genital femenino, tubo digestivo bajo	Hidrólisis de hipurato, CAMP ^d positivo	Sepsis neonatal y meningitis, bacteriemia en adultos
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subespecies <i>equisimilis</i> ; otros	C, G	β (infecciones humanas), α , ninguno	Faringe	Colonias grandes (>0.5 mm)	Faringitis, infecciones piógenas similares a estreptococos del grupo A
<i>Enterococcus faecalis</i> (y otros enterococos)	D	Ninguna, α	Colon	Cultivo en presencia de bilis, hidroliza esculina, desarrollo en NaCl al 6.5%, PYR positivo	Absceso abdominal, infección de las vías urinarias, endocarditis
Grupo de <i>Streptococcus bovis</i>	D	Ninguna	Colon, árbol biliar	Cultivo en presencia de bilis, hidroliza esculina, ningún desarrollo en NaCl al 6.5%, degrada almidón	Endocarditis, se aísla con frecuencia en hemocultivo en pacientes con cáncer de colon, enfermedades biliares
Grupo de <i>Streptococcus anginosus</i> (<i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , grupo de <i>S. milleri</i>)	F (A, C, G) y no tipificable	α , β , ninguna	Faringe, colon, aparato genital femenino	Variantes de colonia pequeña (<0.5 mm) de especies hemolíticas β . Los microorganismos del grupo A son resistentes a la bacitracina y son PYR negativos. Tipos de fermentación de carbohidratos	Infecciones piógenas, incluidos abscesos cerebrales
Estreptococos <i>viridans</i> (muchas especies)	Por lo general no tipificado o no tipificable	α , ninguna	Boca, faringe, colon, aparato genital femenino	Resistente a optoquina. Colonias insolubles en bilis. Tipo de fermentación de carbohidratos	Caries dental (<i>S. mutans</i>), endocarditis, abscesos (con muchas otras especies bacterianas), algunas especies como <i>Streptococcus mitis</i> , tienen un alto grado de resistencia a la penicilina
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ninguna	α	Nasofaringe	Susceptibilidad a la optoquina. Colonias solubles en bilis, positividad en la reacción tumefacción capsular	Neumonía, meningitis, endocarditis, otitis media y sinusitis
<i>Peptostreptococcus</i> (muchas especies) (véase cap. 21)	Ninguna	Ninguna, α	Boca, colon, aparato genital femenino	Anaerobios obligados	Abscesos (con otras múltiples especies de bacterias)

^a Clasificación de Lancefield.

^b Hemólisis observada en agar sangre de carnero al 5% después de la incubación durante la noche.

^c Hidrólisis de L-pirrolidonil-2-naftilamida.

^d Prueba de Christie, Atkins, Munch-Peterson.

2. Patrones hemolíticos: algunos estreptococos producen hemólisis, así tenemos hemólisis total o beta (β), donde hay destrucción total de los glóbulos rojos generando una zona más clara alrededor de la colonia; hemólisis parcial o alfa (α), donde hay una reducción de hemoglobina con lisis parcial de glóbulos rojos sumado a la formación de un pigmento verde; y ausencia de hemólisis o gamma (γ), donde algunos de los estreptococos son no hemolíticos (19,20) (Ilustración 1).

3. Pruebas bioquímicas: incluyen fermentación de carbohidratos, determinación de enzimas y la resistencia a diferentes compuestos químicos; se usan generalmente para la clasificación luego de la evaluación de las características de la colonia. Pueden ser utilizadas en aquellas que no son tipificables según la clasificación de Lancefield (19).



Ilustración 1. Patrones hemolíticos de los *Streptococcus* spp.

Fuente: Buxton R (21)

2.2.2. *Streptococcus agalactiae*

a. Antecedentes históricos

A finales del siglo XIX, el uso de medios de cultivo sólidos permitió el estudio de los estreptococos. Hugo Schottmuller a inicios del siglo XX, demostró la hemólisis de los estreptococos en agar sangre; tiempo después J. H. Brown, investigador del Instituto Rockefeller, fue quien describió las reacciones de hemólisis alfa, beta y gamma en los estreptococos (22).

En el año 1882 Christensen describe EGB causando mastitis en ganado vacuno. En el año 1938 fue presentado por primera vez como patógeno humano por Fry, quien describió tres casos de sepsis puerperal mortal. Antes que Fry, Lancefield y Hare habían identificado a estos microorganismos en cultivos vaginales de mujeres asintomáticas posparto (23).

Hasta fines de 1960 los casos de EGB eran pocos conocidos, a pesar de ser informados como casos esporádicos. Sin embargo, es ahí cuando cobra importancia como patógeno perinatal en los Estados Unidos y Europa. Luego, en la década de los 70, el EGB es reconocido como el causante más importante de sepsis y meningitis en neonatos y en lactantes pequeños, así como la causa de enfermedad principal en gestantes (24).

EGB se ha mencionado a nivel mundial durante los últimos 30 años como uno de los patógenos más importantes que causan infección perinatal (22).

A partir de la década de los 90, se implementaron una serie de recomendaciones acerca de la profilaxis materna intraparto, lo que generó una disminución notable de la incidencia de las infecciones neonatales precoces y la reducción drástica de la incidencia de la enfermedad invasiva en gestantes (25). Sin embargo, también se observó que la frecuencia de infecciones invasivas en adultos no gestantes aumentaron a comparación de los años anteriores, demostrándose con algunos estudios que la incidencia de la enfermedad de EGB en adultos se duplicó de 3,6 casos por 100,000 personas durante 1990 a 7,3 casos por 100,000 personas durante 2007. Además, que éstas se presentan con mayor frecuencia en individuos mayores de 65 años o con alguna patología de base (88-95%), siendo la diabetes y cáncer los más importantes (26,4).

Con la intención de un mejor conocimiento de la enfermedad y la epidemiología de estas infecciones, se vienen intensificando los esfuerzos en las investigaciones de los últimos años que mejoren los métodos de detección para un efectivo control y prevención (27).

b. Fisiología y estructura

El EGB es un coco Gram positivo, negativo a la prueba de oxidasa y catalasa, anaerobio facultativo perteneciente al grupo B de Lancefield, usualmente se lo encuentra en cadenas cortas en muestras de origen clínico o cadenas largas en colonias de cultivo (1). Las colonias de EGB aisladas en agar sangre de carnero al 5% tienen de 3-4 mm de diámetro, de aspecto liso y un color blanco grisáceo, rodeadas por una estrecha zona de beta hemólisis, en algunos

casos sólo capaz de evidenciar al mover la colonia. También se ha observado algunas cepas no hemolíticas (3 a 5%) (1, 25). Esta bacteria es capaz de hidrolizar al hipurato de sodio. Presenta resultados negativos para las siguientes pruebas: prueba de sensibilidad a la bacitracina 0,04 U (BA), lo que permite diferenciarlo del *Streptococcus pyogenes*, prueba de L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) y prueba de Vogues-Proskauer (VP), da un resultado variable en la fermentación de trehalosa y glicerol, es incapaz de fermentar el sorbitol y fermentan la glucosa, maltosa y sacarosa (19, 1).

La prueba de Christie, Atkins y Munch-Petersen (CAMP) descrita en 1944 es utilizada para la identificación presuntiva de EGB (28). Sin embargo, esta no tiene alta especificidad, ya que el factor CAMP puede ser producido por otros grupos de estreptococos (C, F y G) (29). El factor CAMP es una proteína extracelular termoestable que aumenta la actividad hemolítica de la β -hemolisina (esfingomielinasa C) de *Staphylococcus aureus* frente a hematíes de carnero (28).

Otro criterio de identificación presuntiva es la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, ya que puede producir folato a partir de la utilización de la timidina presente en los medios de cultivo (30).

c. Clasificación y Tipificación

El EGB puede ser clasificado en función de tres marcadores serológicos:

1. Carbohidrato del grupo B (o antígeno polisacárido de la pared celular): es la base de la clasificación de Lancefield; es una molécula ubicada sobre la superficie externa de la pared celular y fijada a la capa del peptidoglucano mediante un enlace fosfodiéster, común a todas las cepas y serotipos de EGB (Ilustración 2). El carbohidrato del grupo B está compuesto de ramnosa, galactosa, N-acetilglucosamina y glucitol. Estos azúcares forman cuatro unidades de oligosacáridos estructuralmente únicas, unidas por enlaces fosfodiéster para crear una estructura altamente ramificada y compleja (Ilustración 3). La posición terminal y la abundancia de ramnosa sugirieron que este azúcar constituiría o sería parte de un epítipo inmunodominante, que más adelante sería demostrado que los anticuerpos que se forman frente a estos no tienen la capacidad de dar protección frente a una infección (1, 31).

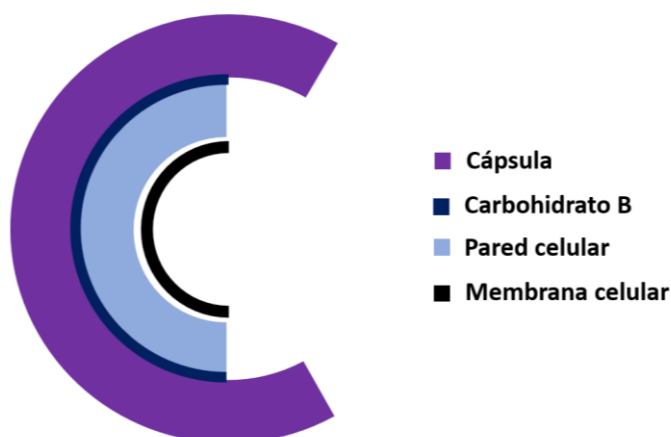
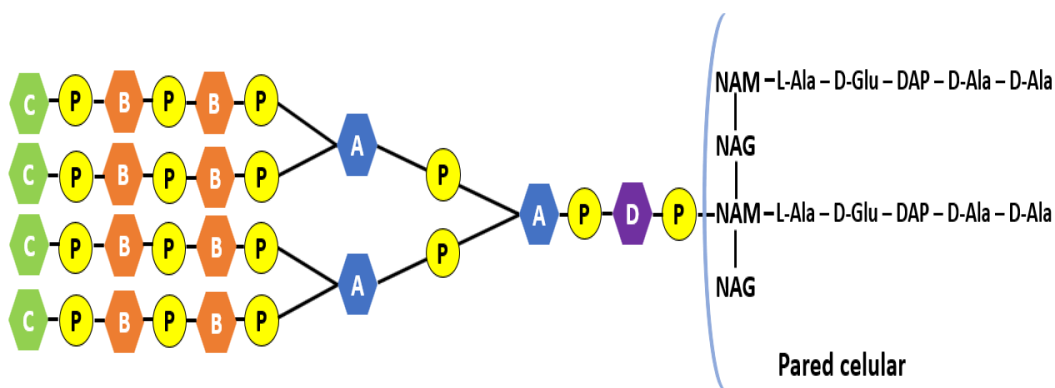


Ilustración 2. Estructura del *Streptococcus agalactiae*

Fuente: autoría propia



A $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}[\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}]\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{1')-D Glucitol-(3'-1)-}\alpha\text{-L-Rhap.}$

B $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}[\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{4)-}]\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{1')-D Glucitol-(3'-1)-}\alpha\text{-L-Rhap.}$

C $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{1')-D Glucitol-(3'-1)-}\alpha\text{-L-Rhap.}$

D $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{4)-D-GlcNAc.}$

P Fosfato

Ilustración 3. Estructura del carbohidrato del grupo B

Fuente: Modificado de Paoletti LC, Kasper DL (31)

2. La sustancia S [polisacárido capsular (PC)]; es expresada en grandes cantidades en la superficie y consta de diferentes unidades repetidas, tres o cuatro de cinco azúcares posibles: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ramnosa y ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico), las distintas disposiciones de estos componentes determinan la especificidad del serotipo y permite caracterizar en diez serotipos únicos y diferentes (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX). La función de este PC es eludir el sistema inmune del huésped interfiriendo en la fagocitosis (1). Los anticuerpos que se forman frente a PC tienen la capacidad de dar protección frente a una infección (22, 27).

3. Los antígenos proteicos de superficie conocidos como antígeno C, son designados sólo con la letra C y existen dos tipos diferentes: c-alfa y c-beta. Es así, la designación de estos serotipos para aquellos EGB que tienen antígeno C se denominan como Ib/c y II/c. Este está presente en las cepas tipo Ia y Ib en el 100%, en las cepas tipo II en el 60%, y en las cepas de tipo III raramente se encuentran (1, 22).

Para la serotipificación de EGB han sido utilizado distintas técnicas, algunas basadas en reacciones de aglutinación con partículas de látex, otras por coaglutinación, algunas por contrainmunolectroforesis, entre otras con especificidad moderada donde se ha observado muchos aislados no tipables o con errores de serotipificación; sin embargo, con la llegada de las técnicas moleculares muchos más específicos y reproducibles, mayormente dirigidos a detectar el operón cps de EGB (32).

d. Hábitat

EGB es un microorganismo comensal perteneciente a la microbiota del tracto gastrointestinal que suele colonizar el tracto genitourinario de mujeres sanas (2), siendo un problema en pacientes inmunocomprometidos ya que también puede infectar otras zonas del cuerpo actuando como un patógeno (33).

e. Factores de virulencia

El EGB se caracteriza por que la mayoría de estos están asociados a genes de virulencia, los cuales producen proteínas que son necesarias en la relación entre bacteria-célula-huésped, durante el proceso de la enfermedad (14).

EGB es capaz de evadir ciertas barreras inmunológicas como prevenir su fagocitosis por las células del huésped. Así mismo puede invadir a las células epiteliales, y de esta manera, propagarse hacia el torrente sanguíneo (34) (Tabla 2).

Todo esto es posible gracias a sus características como son su polisacárido capsular, adhesinas de unión a la fibronectina, así como hemolisinas y su factor CAMP; de igual manera presenta varias proteasas (35) (Ilustración 4). Además, el ácido lipoteicoico D-alanilado y la superóxido dismutasa juegan un papel significativo (36).

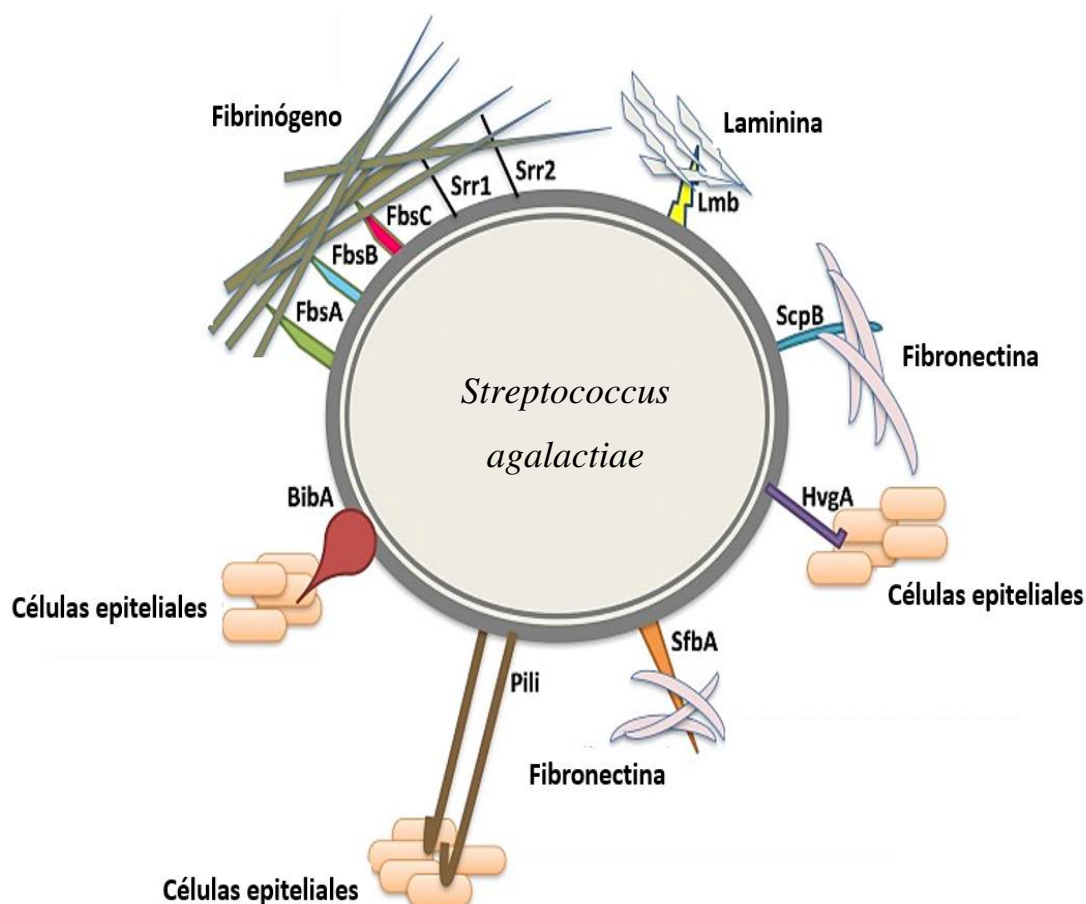


Ilustración 4. Principales adhesinas que median la interacción de *Streptococcus agalactiae* con células huésped (37)

FbsA, FbsB y FbsC: proteínas de unión a fibrinógeno; Srr1 y Srr2: glucoproteínas repetitivas ricas en serina; Lmb: proteína de unión a laminina; ScpB: peptidasa estreptocócica C5a del grupo B; HvgA: adhesina hipervirulenta EGB; SfbA: proteína de unión a fibronectina estreptocócica A; BibA: adhesina bacteriana inmunogénica EGB.

Es claro que el principal factor de virulencia del EGB es el PC, esto debido a que el ácido siálico que lo conforma tiene la capacidad de inhibir el complemento por la inactivación de la ruta alterna, evadiendo la fagocitosis (38).

La producción de hemolisina, es un factor de virulencia muy importante, que se encuentra asociada a la producción de un pigmento, que va a actuar en la formación de poros en la célula huésped produciendo de esta manera la lisis (27).

El ácido lipoteicoico puede participar facilitando la adherencia como primer paso de la infección (22).

Otros factores de virulencias son las proteínas de superficie de EGB. El primer antígeno proteico de superficie identificado en EGB fue el antígeno C, constituido por las proteínas α y β y que podrían ser expresados de forma individual o ambas proteínas juntas, con las designaciones alfa-C (α -C) y beta-C (β -C).

Lancefield realizó la importante observación de que los anticuerpos contra el antígeno C confieren protección frente a la infección por EGB en un modelo de ratón, lo que implica que no solo la cápsula sino también las proteínas de la superficie pueden provocar inmunidad protectora (36).

La proteína α -C, que es codificada por el gen *bca* y se relaciona con la adherencia a las células epiteliales. Se encuentra comúnmente en las cepas de los serotipos Ia, Ib y II, pero casi nunca en las cepas de tipo III y rara vez en el tipo V (12, 36).

La proteína Rib, que es codificada por el gen *rib*, se identificó como una proteína única de alto peso molecular en extractos de pared celular de cepas de tipo III. La caracterización de la proteína purificada indicó que estaba relacionada con la proteína α -C, pero no eran idénticas. Lo más importante es que los anticuerpos contra Rib aseguraron inmunidad protectora contra la infección letal con cepas que expresan Rib. La proteína Rib se expresa por la gran mayoría de las cepas de serotipo III, por muchas cepas de tipo II y por algunas cepas de tipo V (12, 36).

La proteína β -C, que es codificada por el gen *bac* y se relaciona con la invasión de las células epiteliales y además interactúa con dos componentes del sistema inmunitario humano, la

fracción Fc de las IgA provocando la inhibición de la fagocitos; y el factor H (FH), una proteína plasmática de cadena única que inhibe la activación del complemento a través de la vía alternativa; lo que sugiere que desempeña un papel en la evasión inmunológica y provoca inmunidad protectora. Esta proteína se encuentra en casi todas las cepas del serotipo Ib y en una minoría de las cepas de los serotipos Ia, II y V, pero casi nunca en las cepas del serotipo III (36, 39).

La proteína HylB, que es codificada por el gen *hylB*. La hialuronato liasa es un factor de virulencia que ayuda a este patógeno a atravesar la barrera biofísica de los tejidos del huésped por la degradación enzimática del hialuronato y ciertos sulfatos de condroitina en los enlaces glucosídicos β -1,4 (40, 41).

Adhesinas de EGB a proteínas de matriz extracelular (MEC)

Como comensal oportunista que constituye una parte de la microbiota fisiológica intestinal y vaginal, la colonización por EGB, la persistencia, la translocación y la invasión de las barreras del huésped dependen en gran medida de su capacidad de adherencia a las células del huésped y a la MEC (42, 43). Las adhesinas funcionalmente caracterizadas que median la invasión y/o la adherencia de EGB dentro del huésped son:

La proteína de unión a laminina (Lmb), que es codificada por el gen *lmb*, es una lipoproteína expuesta a la superficie, se expresa en la mayoría de las cepas de EGB, desempeña un papel en la colonización y/o invasión del epitelio dañado y la posterior translocación al torrente sanguíneo, mediando la adhesión de EGB a la laminina humana, que es un componente principal de la membrana basal de todo el cuerpo humano. Se cree que la proteína Lmb parece tener un papel pronunciado en el tropismo bacteriano del sistema nervioso central (12,36).

Las proteínas de unión a fibrinógeno (Fbs): se han caracterizado cinco Fbs en EGB; FbsA, FbsB, las glucoproteínas repetitivas ricas en serina Srr1 y Srr2, y FbsC o BsaB. FbsA promueve la adhesión (44), mientras que FbsB es necesario para invadir células humanas (39, 45). Srr1 y Srr2 median la invasión de células endoteliales microvasculares (46, 47).

Además, Srr1 promueve la colonización vaginal (48). FbsC se caracteriza por promover la invasión de barreras epiteliales y endoteliales y la formación de biopelículas (49).

La peptidasa estreptocócica C5a del grupo B (ScpB), codificada por el gen *scpB*, es una serina proteasa que inactiva la activación del complemento mediante la división del quimioatrayente neutrófilo C5a humana, producido durante la activación del complemento. El gen *scpB* se ubica inmediatamente aguas arriba del gen *lmb* (36, 37).

La proteína de unión a fibronectina estreptocócica A (SfbA) media la invasión celular pero no la adherencia. SfbA está directamente involucrado en la unión de fibronectina y la invasión de células endoteliales microvasculares del cerebro humano (50).

Adhesinas de EGB a objetivos celulares:

Además de la adherencia a MEC, la adhesión a las células huésped juega un papel importante en la patogénesis del EGB.

La adhesina bacteriana inmunogénica EGB (BibA), es una proteína anclada a la pared, que contribuye a la colonización de la mucosa por EGB y la adherencia a las células huésped. Se han descrito un total de cuatro variantes de BibA (I, II, III y IV) en EGB (51-53).

La adhesina hipervirulenta EGB (HvgA) también anclada a la pared celular y es específica del clon hipervirulento ST-17. Además, HvgA media la adherencia del EGB a las células epiteliales intestinales, las células epiteliales coroides y las células endoteliales microvasculares (54).

Pili: son apéndices anclados a la pared celular que se extienden desde la superficie bacteriana, se ha demostrado que los pili en EGB están considerados como adhesinas esenciales para promover la colonización de células epiteliales, la persistencia, formación de biopelículas, la translocación y la invasión (37).

Tabla 2. Factores de virulencia del EGB (55)

Factor de virulencia	Objetivo del hospedero	Función
HylB	Ácido hialurónico	Corta el hialurón y promueve la propagación del EGB durante la infección
BsaB / FbsC	Fibrinógeno y laminina	Adherencia a las células epiteliales vaginales
Pigmento hemolítico	Células epiteliales de amnios Neutrófilos Macrófagos	Citólisis Resistencia a los neutrófilos Desgranulación de mastocitos Piroptosis
Pili	Colágeno I	Adherencia a las células epiteliales vaginales
Cápsula	Siglecs	Adherencia e invasión de las células epiteliales cervicales. Señalización de siglecs en células epiteliales de amnios y neutrófilos
Proteína Alfa C	Superficie de la célula huésped glicosaminoglicano	Invasión de células epiteliales cervicales.
Proteína de unión a laminina (Lmb)	Células del huésped uniéndose a la laminina ECM	Colonización y/o invasión del epitelio dañado y la posterior translocación al torrente sanguíneo

f. Manifestaciones clínicas

El EGB es el más frecuente microorganismo causante de la enfermedad invasiva en el RN (sepsis, neumonía y meningitis), además de diferentes infecciones en mujeres gestantes como infecciones del aparato urinario, postquirúrgicas y con fiebre puerperal. Desde el año 2000, el número de casos de infección invasiva causada por EGB en adultos no gestantes, ha ido en aumento, especialmente en aquellas personas mayores a 65 años o con alguna patología de base (16).

Palacios-Saucedo afirma que “La mayoría de la información sobre la infección causada por EGB corresponde a países desarrollados. Aunque existen estudios sobre la infección perinatal por EGB publicados en Colombia, Argentina, Perú y Brasil, la información sobre la epidemiología y el comportamiento de la infección por EGB en América Latina sigue siendo limitada” (55).

EGB y sus complicaciones en RN

EGB posee una gran variedad de fenotipos que le otorgan invasividad y lo hacen capaz de producir enfermedades graves en hospedadores susceptibles, en particular, el neonato humano. Cuando la infección neonatal causada por EGB apareció en la década de 1970, más del 50% de los pacientes morían (56). La transmisión de esta bacteria puede ser vertical, de madre a hijo, u horizontal a partir del medio ambiente (2).

La enfermedad por EGB en los RN se clasifica como infección de inicio temprano (IITem) o infección de inicio tardío (IITar).

Infección de inicio temprano

Se conoce así a la infección sistémica que se desarrolla durante la primera semana de vida (7 días), e inicia alrededor de las 12 horas de vida. Esta puede ocurrir entre el 0,5 a 2% de RN de madres colonizadas en vagina o recto por EGB (1).

IITem está caracterizada por presentar cuadros de bacteriemia, neumonía o meningitis, lo que acontece con una proporción aproximada del 60%, 30% y 10% respectivamente (23). El diagnóstico precoz y la mejora en los tratamientos complementarios ha logrado disminuir la mortalidad a menos del 5%; sin embargo, se ha observado que entre el 15% y el 30% de niños que sobrevivieron a las infecciones neurológicas presentan algunas secuelas como retraso mental grave, ceguera y sordera (1).

Infección de inicio tardío

El síndrome de inicio tardío comienza entre los 7 y los 89 días de edad, con una media de cerca de 24 días. En niños mayores la infección tiene un origen exógeno, por ejemplo, adquirida de la madre u otro niño. La proporción de infantes con meningitis es alta entre aquellos con infección tardía. Otras infecciones que se han asociado con IITar

son por ejemplo etmoiditis, otitis media, osteomielitis, artritis, celulitis/adenitis y conjuntivitis (1).

Infección materna relacionada con la gestación

El EGB causa frecuentemente infecciones en mujeres durante el periodo de gestación o inmediatamente después de esta, infecciones como endometritis postparto, amnionitis, infecciones del aparato genitourinario, infección de la herida del parto, etc. Y estimándose una incidencia de estas infecciones de dos por cada 1000 embarazos (1).

Se ha señalado que la colonización materna y la infección de tracto urinario por EGB durante la gestión pueden estar relacionadas con aborto, parto prematuro y rotura prematura de membranas (2).

Infección en el adulto no relacionada con la gestación

Aunque considerado habitualmente EGB como causa de infección en RN y gestantes, en las últimas décadas más de las dos terceras partes de las infecciones se presentan actualmente en adultos y no se relacionan con embarazo. Si excluimos a la mujer gestante, la mayoría de estos casos se dan en adultos mayores de 65 años (principalmente varones). Generalmente, los adultos que presentan esta infección también tienen una enfermedad de base importante como son diabetes, úlceras de decúbito, VIH, cirrosis hepática, neoplasia, accidente cerebrovascular o disfunción del aparato urinario (19, 27).

Las infecciones en el adulto no relacionadas con la gestación son neumonía, bacteriemia, infecciones de piel y partes blandas e infecciones óseas; además, pueden incluir úlceras infectadas, abscesos, celulitis, e infecciones de heridas postquirúrgicas (26).

g. Epidemiología

Como indica Palacios-Saucedo “hasta principios de 1960, los reportes de casos de enfermedad neonatal por EGB fueron escasos, luego se le reconoció como una de las causas de sepsis neonatal temprana en los Estados Unidos, pasando en la década de los 80 a ser considerada la causa más frecuente de sepsis y meningitis neonatal en muchos países desarrollados” (55).

Éste también menciona que “se considera que EGB puede ser causante de graves enfermedades, especialmente en RN y en mujeres embarazadas y en el puerperio. Aún con el uso de profilaxis antibiótica intraparto (PAI) en países desarrollados, el EGB continúa siendo la causa más frecuente de sepsis y meningitis neonatal, reportándose alrededor de 50,000 infecciones maternas por año y tasas de transmisión vertical al RN del 29-72%” (55). Según afirma Puertas-Prieto “La incidencia de esta forma de la enfermedad ha disminuido en EEUU desde 1,8 casos por 1.000 RN vivos en los años 90 hasta 0,25 por 1.000 nacidos vivos en 2013. En España la incidencia descendió desde 2,4 por 1.000 nacidos vivos en 1996 hasta 0,33 en 2008, siendo este comportamiento atribuido a la implementación del cribado universal para EGB en la embarazada y a la difusión de PAI” (27).

Al ser el EGB un colonizador del aparato digestivo inferior y colonizador accidental del aparato genitourinario; cerca del 10% al 40% de las embarazadas suele presentar colonizaciones o infecciones a nivel vaginal (57), la prevalencia de esta bacteria varía según localización geográfica, clima, condiciones de salud, acceso a servicios de salud, etc (14). Se calcula que entre 50% y 70% de los RN se pueden colonizar a través de la madre y que, si esto sucediera podrían desarrollar enfermedad invasiva entre 1% y 2% (58).

Alrededor del 60% de neonatos provenientes de madres colonizadas con el EGB se colonizan durante el parto aumentado el riesgo de infección si la madre presenta un recuento elevado de bacterias (1), otros factores que incrementan el riesgo de colonización de este patógeno hacia el neonato son: si la madre es menor de 20 años (33), que el parto sea prematuro es decir que se dé antes de las 37 semanas de gestación, la presencia de fiebre al momento del alumbramiento y en mujeres multíparas el antecedente de hijos que presentaron colonización del EGB (59).

Según el Centers for Disease Control and Prevention (CDC), en los Estados Unidos, en promedio (60, 61):

- Cada año alrededor de 900 bebés contraen la enfermedad por EGB de inicio temprano y alrededor de 1200 bebés contraen la enfermedad de inicio tardío.
- De cada 50 bebés que tengan la enfermedad por EGB, entre 2 y 3 (4 a 6%) morirán.
- Alrededor de 1 de cada 4 mujeres embarazadas son portadoras de EGB.

- Los médicos deben hacer pruebas de detección de EGB a las mujeres embarazadas durante las semanas 35 y 37. Una mujer embarazada que haya sido positiva para la detección de EGB y que reciba antibióticos durante el trabajo de parto tendrá una probabilidad de sólo 1 en 4000 de dar a luz un bebé que presentará la enfermedad por EGB. Si no recibe antibióticos durante el trabajo de parto, sus probabilidades son de 1 en 200.

La tasa de los casos graves de enfermedad por EGB aumenta con la edad:

- En promedio, morirá 1 de cada 20 personas adultas no embarazadas que tengan una infección grave por EGB. Cada año, hay 10 casos por cada 100 000 personas adultas no embarazadas.
- La edad promedio de los casos en las personas adultas no embarazadas es de alrededor de 60 años.
- Cada año, hay 25 casos por cada 100 000 adultos de 65 años o más.

Se ha identificado la existencia de diez serotipos Ia, Ib, II-IX en EGB y la identificación de los serotipos más frecuentes de esta bacteria se han realizado en varios países del mundo, dando como resultado que los serotipos Ia, II, III y V son los más frecuentes (62).

En Latinoamérica de igual manera, existen algunos datos sobre la prevalencia de los diferentes serotipos, arrojando que los serotipos más encontrados han sido III y V (14). El EGB presenta diferentes serotipos que se asocian con mayor frecuencia a la enfermedad del RN siendo los más comunes los serotipos: Ia, Ib, II, III y V (1).

Según menciona Crespo-Ortiz “El comportamiento de la infección neonatal por EGB se ha estudiado en diversas áreas geográficas mostrando características diversas. La prevalencia de colonización materna es variable, en países de Europa oscila entre 7% y 36%; en Medio Oriente y África, entre 19% y 22%; en Asia, es de 19%; en Norte América 26% y en Centro y Sur América, 14%. Históricamente se ha asumido que el nivel de colonización en gestantes en países en desarrollo es menor. En Latinoamérica, la importancia y el impacto de esta bacteria en neonatos e individuos susceptibles no es claro y el número de estudios epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico sigue siendo limitado. No obstante estudios

realizados en países de Latinoamérica como Brasil, México, Venezuela, Chile, Uruguay, Argentina y Perú, y en el Caribe han descrito prevalencias entre 10% y 45%” (58).

EGB sigue siendo generalmente sensible a PE; sin embargo, se ha informado de casos de aislados con sensibilidad disminuida. En relación a ERI y CLI, en los últimos años se ha evidenciado un aumento en las tasas de resistencia llegando al 20% (32). En el estudio de Villar y Hugo (63) en Argentina encontraron para el año 2012 un aumento en la prevalencia de resistencia a ERI y CLI con niveles del 27,5 y 30,3%. La incidencia anual de infecciones por EGB en adultos es de 4 a 8 casos por 100.000, esta cifra se puede incrementar hasta en 30 casos por 100.000 adultos mayores de 65 años, con una mortalidad que supera el 10% (27).

h. Terapia antibiótica

PE sigue siendo el antibiótico de primera línea y de mayor uso clínico en pacientes no alérgicos a estos, con infección por EGB (63), mientras que el uso de ERI o CLI (antibióticos de segunda línea) han sido recomendados para tratamientos en pacientes alérgicos a betalactámicos (5). Con el pasar de los años el uso de estos ha generado la aparición de resistencias a ERI y CLI (64). En el 2008 Japón y Estados Unidos han informado que algunos aislados de EGB presentaron sensibilidad disminuida a PE, esto debido a una mutación en los genes que codifican una transpeptidasa (PBP 2X). La consecuencia clínica de esto aún no ha sido aclarada y hasta la fecha, los betalactámicos siguen siendo los antibióticos de elección frente a EGB (65).

Mecanismo de resistencia a los macrólidos y lincosamidas

En cuanto a los mecanismos de resistencia a macrólidos, han sido identificados dos (Tabla 3): (i) Modificación del sitio diana; ocurre en los ribosomas a través de un ARNr metilasa que modifica un residuo de adenina del ARNr 23S. Provoca un cambio conformacional en el ribosoma que da lugar a una menor afinidad de unión de los macrólidos (de 14, 15 y 16 átomos) y también de lincosamidas y estreptograminas B, por su diana a nivel de la subunidad ribosomal 50S. Por lo tanto, el fenotipo de resistencia en las cepas con este mecanismo de resistencia es denominado macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B), siendo la bacteria resistente a los tres grupos de antimicrobianos. Las metilasas se encuentra

codificada por genes *erm* (erythromycin ribosomal **m**ethylase): *ermA* (subclase TR) y *ermB* (66). La resistencia MLSb puede expresarse de dos formas: constitutiva (fenotipo cMLSb) o inducible (fenotipo iMLSb). En el fenotipo constitutivo (se expresa tanto en presencia como en ausencia de macrólidos) evidencia un alto nivel de resistencia a los antimicrobianos del grupo MLSb y resistencia absoluta en antibiograma por difusión a ERI y CLI. En el fenotipo inducible (solo se expresa previa inducción, en presencia de ERI) presenta resistencia solamente a macrólidos con 14 átomos (ejm. ERI) y con 15 átomos (azitromicina); sin embargo, se observa *in vitro* sensibilidad a macrólidos con 16 átomos, lincosamidas (ejm. CLI) y estreptograminas B, la sensibilidad a CLI es afectada por la presencia de un inductor. Como lo menciona Laczeski “la inducción ha sido relacionada a la presencia de cladinosa en macrólidos con 14 y 15 átomos. Aquellos macrólidos con 16 átomos y las lincosamidas, no son capaces de inducir la metilasa por carecer de este azúcar” (67). De esta manera las cepas de EGB con fenotipo iMLSb son sensibles a CLI “*in vitro*” pero deben ser informadas como resistentes (R), no siendo CLI efectiva clínicamente, ya que inducen lentamente resistencia con el consiguiente fracaso terapéutico (68). Esta característica de la ERI como inductor se aprovecha en una prueba *in vitro* que sirve para detectar iMLSb, prueba del doble disco difusión en agar (D-Test), recomendada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (69).

(ii) Mecanismo de eflujo; mediado por el gen *mefA* (**m**acrolide **e**fflux), es una bomba de expulsión del antibiótico fuera de la bacteria mostrando resistencia de bajo nivel a macrólidos con 14 átomos y sensibilidad a lincosamidas y estreptograminas (fenotipo M) (70).

Como ya fue mencionado por Tamariz “los métodos de identificación de este tipo de resistencia, se basan algunos en la expresión fenotípica, como es el caso del ensayo de inhibición D-Test; esta prueba identifica la resistencia inducible, pudiendo presagiar la mutación hacia una resistencia constitutiva *in-vivo*. También se pueden detectar los genes implicados mediante pruebas moleculares como PCR. Este tipo de resistencia no puede ser detectada usando los métodos convencionales de disco difusión, tampoco mediante métodos de dilución en caldo o en placa convencionales” (71).

Tabla 3. Fenotipos de resistencia a antibióticos MLSb que se pueden detectar en *Streptococcus* y posibles mecanismos asociados (72,73).

Fenotipo de Resistencia	La bacteria es resistente a los antibióticos:	Mecanismo de Resistencia
Sensible	Sensible a todos los antibióticos MLSb	Sin mecanismo
MLSb*	Macrólidos Lincosamidas Estreptograminas del grupo B	Metilasa rRNA 23S
M	Macrólidos	Bomba de eflujo activo
L	Lincosamidas	Inactivación

*La expresión puede ser constitutiva (la resistencia se expresa siempre) o inducible (la resistencia se expresa sólo previa inducción con eritromicina).

La resistencia a lincosamidas, entre ellas CLI, está mediada por una familia de genes denominados *lnu*. Estos genes son capaces de codificar a una enzima *O*-nucleotidiltransferasa los cuales pueden inactivar a las lincosamidas por una adenilación en el grupo hidroxilo de la posición 3 del antibiótico (74). En específico el gen *lnuB* se encuentra presente en un gran plásmido conjugativo que solo hidroliza a lincosamidas, pero no a los macrólidos presenciado una visualización fenotípica de sensibilidad a ERI y resistencia de CLI con un D-test negativo (74, 75).

La transmisión de estos genes de resistencia son vehiculizados por elementos genéticos móviles por lo que se pueden transmitir de manera vertical y horizontal, esto hace necesaria la continua investigación de los mecanismos de resistencia a macrólidos en EGB. No solamente para la identificación genotípica y fenotípica sino también para estar alertas a la presencia de nuevos mecanismos de resistencia (76). La importancia del conocimiento de estos fenotipos, permite mejorar el tratamiento, sean estos profilácticos o terapéuticos. En otros términos, si EGB es aislado de un paciente y presenta fenotipo iMLSb, es importante

dar a conocer al médico las consecuencias del uso de CLI, mientras que el fenotipo M permite usar como profilaxis CLI.

i. Marco Conceptual

- **Neonato:** recién nacido que tiene 27 días o menos desde su nacimiento, bien sea por parto natural o por cesárea.
- **Aislado:** microorganismo recuperado de una persona.
- **Virulencia:** grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.
- **Genes de virulencia:** genes que codifican proteínas y/o factores de virulencia.
- **Gen *lmb*:** codifica para la proteína Lmb, que media la adherencia del EGB a la laminina humana que juega un rol en la invasión y daño epitelial.
- **Gen *bca*:** que codifica la proteína α -C asociada a la adherencia a la célula epitelial.
- **Gen *rib*:** codifica para la proteína Rib, proteína de inmunidad, genera resistencia a la proteasa, es expresada en la mayoría de las cepas invasivas.
- **Genes de resistencia:** genes que codifican proteínas y/o factores de resistencia.
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction), esta una técnica que se utiliza para amplificar un fragmento de ADN.
- **Electroforesis:** es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico en geles de agarosa, para evaluar si se logró una amplificación exitosa, a través de la visualización del fragmento amplificado.
- **Sensible:** cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- **Intermedio:** cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto. Dependiendo del sitio de infección.
- **Resistente:** cuando un aislado bacteriano que no es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Es un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal.

3.2. Consideraciones éticas

Los aislados de EGB se obtuvieron de muestras clínicas procedentes de pacientes ambulatorios de ambas instituciones de salud, a las cuales se les realizó el cultivo microbiológico como parte de los procedimientos clínicos habituales en los Laboratorios de Microbiología, por lo cual no se solicitó la autorización de los pacientes. Se garantiza que los datos obtenidos se trataron en completa confidencialidad de acuerdo a las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica (77).

3.3. Unidad de análisis

Aislados de EGB.

3.4. Muestra

Todos los aislados de EGB obtenidos a partir de muestras enviadas con solicitud de cultivo al servicio de microbiología “Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé” y al servicio de microbiología de un laboratorio privado, ubicados en la ciudad de Lima entre enero de 2019 y abril de 2019.

3.5. Tamaño de muestra

31 aislados de EGB recolectados entre enero de 2019 y abril de 2019.

3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos

Para cada uno de los 31 aislados se utilizó una ficha de recolección de datos (Anexo1). La identificación de los aislados fue realizada en el equipo Vitek 2 Compact (BioMérieux). Los mismos se conservaron en medio Agar Tripticasa de Soja (TSA), luego almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

3.6.1. Recuperación de los aislados y confirmación de la identificación:

En el “Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical, Daniel A. Carrión, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”, se realizó la confirmación de la pureza de los aislados almacenados en TSA, sembrándolos en agar sangre de carnero al 5%; evaluando la hemólisis, se realizaron también las pruebas de gram, catalasa, CAMP y resistencia a la BA.

3.6.2. Detección fenotípica de la resistencia:

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron con la tarjeta AST-GP67 del equipo Vitek® 2 (BioMérieux) el cual trabaja con una técnica de microdilución, para los antibióticos: PE, ampicilina (AMP), ERI, CLI, vancomicina (VA) y LEV. Los datos obtenidos fueron interpretados siguiendo las recomendaciones del CLSI (69).

3.6.3. Detección genotípica de factores de virulencia mediante PCR simple:

Los genes de los factores de virulencia fueron investigados mediante PCR simple, en el “Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Tropical, Daniel A. Carrión, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos”. Los genes investigados fueron: *lmb*, *bca* y *rib*.

3.6.4. Obtención de ADN total:

Se realizó la extracción de ADN obtenido por lisado celular mediante tratamiento térmico. Los microorganismos en estudio fueron cultivados durante 24 horas, luego se suspendieron varias colonias en agua milliQ (200 µL). Fueron colocados en un thermoblock a 100°C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 2 minutos (78). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y conservado a -20°C.

3.6.5. Detección de genes de virulencia *lmb*, *bca* y *rib*:

Los genes de virulencia estudiados fueron los que codifican la laminina (*lmb*), la proteína C (*bca*) y la proteína Rib (*rib*). Se amplificaron los genes codificantes por PCR, empleando

cebadores específicos, utilizando como molde ADN total. Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos cebadores (5'- 3') descritos en la Tabla 4.

Se optimizaron los volúmenes y concentraciones para la mezcla de reacción de la PCR de cada uno de los genes de virulencia como se indica en la Tabla 5. Además, se estableció un protocolo para la amplificación de la PCR detallada en Tabla 6, realizando algunas modificaciones del protocolo de Laczeski (15).

Tabla 4. Secuencia de cebadores utilizados para amplificar los genes de virulencia en EGB

Genes	Proteína	Oligonucleótido:	Amplícón (pb)	GenBank
<i>lmb</i>	Lmb	F:GACGCAACACACGGCAT R:TGATAGAGCACTTCCAAATTTG	300	AF062533.1
<i>bca</i>	C	F:CAGGAAGGGGAAACAACAGTAC R:GTATCCTTTGATCCATCTGGATACG	184	M97256.1
<i>rib</i>	Rib	F:CAGGAAGTGCTGTTACGTAAAC R:CGTCCCATTAGGGTCTTCC	369	U58333.1

Tabla 5. Mezcla de reacción para la PCR

REACTIVOS	VOLUMEN (μL)		
	<i>lmb</i>	<i>bca</i>	<i>rib</i>
Agua milliQ estéril	14,90	15,40	14,90
Buffer 10x (libre de MgCl ₂)	2,50	2,50	2,50
MgCl ₂ 25 mM	2,00	1,50	2,00
dNTPs 2.5 Mm	2,00	2,00	2,00
Cebador F 10 pmol/μL	0,50	0,50	0,50
Cebador R 10 pmol/μL	0,50	0,50	0,50
Taq 5U/μL	0,10	0,10	0,10
ADN	2,50	2,50	2,50
Volumen final	25	25	25

Tabla 6. Detalle del ciclado de la PCR para la amplificación de los genes de virulencia en EGB

	<i>lmb- rib</i>	<i>ciclos</i>	<i>bca</i>	<i>ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95 x 5 minutos	-	95 x 5 minutos	-
Desnaturalización	95 x 30 segundos	30	95 x 30 segundos	32
Hibridación	50 x 30 segundos		50 x 30 segundos	
Extensión	72 x 45 segundos		72 x 45 segundos	
Extensión final	72 x 5 minutos	-	72 x 5 minutos	-

3.6.6. Electroforesis:

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en agarosa al 1.5% conteniendo RedSafe (0,5 µg/mL). Para ello, se mezclaron 10µL de cada producto con 2µL de buffer de carga de ADN 10x y luego se colocó 10µL en el gel. Se incluyó también un marcador de peso molecular de 100 pb (ladder), el cual es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. Se corrió a 80 voltios por 35 minutos. Las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador UV.

3.7. Procesamiento de la información o de datos

Se realizó un estudio descriptivo univariado de cada uno de los aislados en estudio, clasificándolas en la presencia y no presencia de genes de virulencia, para la determinación de los porcentajes de frecuencia, los datos se analizaron en Microsoft Excel 2010. Para determinar el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos se introdujeron los datos en Microsoft Excel y en el programa World Health Organization Net Versión 5.6 (WHONET).

3.8. Variables

Variable dependiente:

Genes de virulencia: *lmb*, *bca* y *rib*,

Perfil de susceptibilidad: sensible, intermedio, resistente.

Variable independiente:

Aislados de *Streptococcus agalactiae*.

IV. RESULTADOS

Se colectaron un total de 31 aislados de EGB entre enero de 2019 y abril de 2019: 19 aislados del laboratorio de microbiología del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé y 12 aislados del servicio de microbiología de un laboratorio privado. De las cuales, 22/31 (71%) se obtuvieron de muestras de orina y 9/31 (29%) de secreción vaginal (SV) (los datos completos se muestran en el anexo 2).

Para confirmar la pureza de los aislados, estos fueron sembrados en agar sangre de carnero al 5%, observándose en el 100% de ellos β hemólisis, en la tinción de Gram se observaron cocos gram positivos, todos fueron negativos para la prueba de catalasa; además, resistentes a BA y positivos a la prueba de CAMP (Ilustración 5).



Ilustración 5. Prueba de CAMP

A: control negativo CAMP (-); B: aislado 19A-352 CAMP (+)

Fuente: autoría propia

Caracterización molecular de genes de virulencia

El análisis por PCR reveló que el gen de virulencia *lmb* fue detectado en 23/31 (74,2%) de los aislados, el gen *bca* en 19/31 (61,3%) y el gen *rib* en 8/31 (25,8%) (Ilustración 6). En 2 de los aislados no se evidenció la presencia de ninguno de los genes estudiados. Se detectó que 21/31 (67%) de los aislados tuvieron más de un gen de virulencia: 14/31 (45,2%) fueron positivos para genes *lmb-bca* y 7/31 (22,6%) para *rib-lmb* (Tabla 7). Las bandas correspondientes a los genes se pueden visualizar en las ilustraciones 7, 8 y 9.

Tabla 7. Presencia de genes de virulencia en los aislados de EGB

Genes de virulencia	Orina (n= 22)	Secreción vaginal (n=9)	TOTAL (n=31)
	n (%)	n (%)	n (%)
No detectado	2 (9,1%)	0	2 (6,5)
Sólo <i>lmb</i>	1 (4,5)	1 (11,1)	2 (6,5)
Sólo <i>rib</i>	1 (4,5)	0	1 (3,2)
Sólo <i>bca</i>	4 (18,2)	1 (11,1)	5 (16,1)
<i>lmb-bca</i>	10 (45,5)	4 (44,4)	14 (45,1)
<i>rib-lmb</i>	4 (18,2)	3 (33,3)	7 (22,6)

Fuente: autoría propia

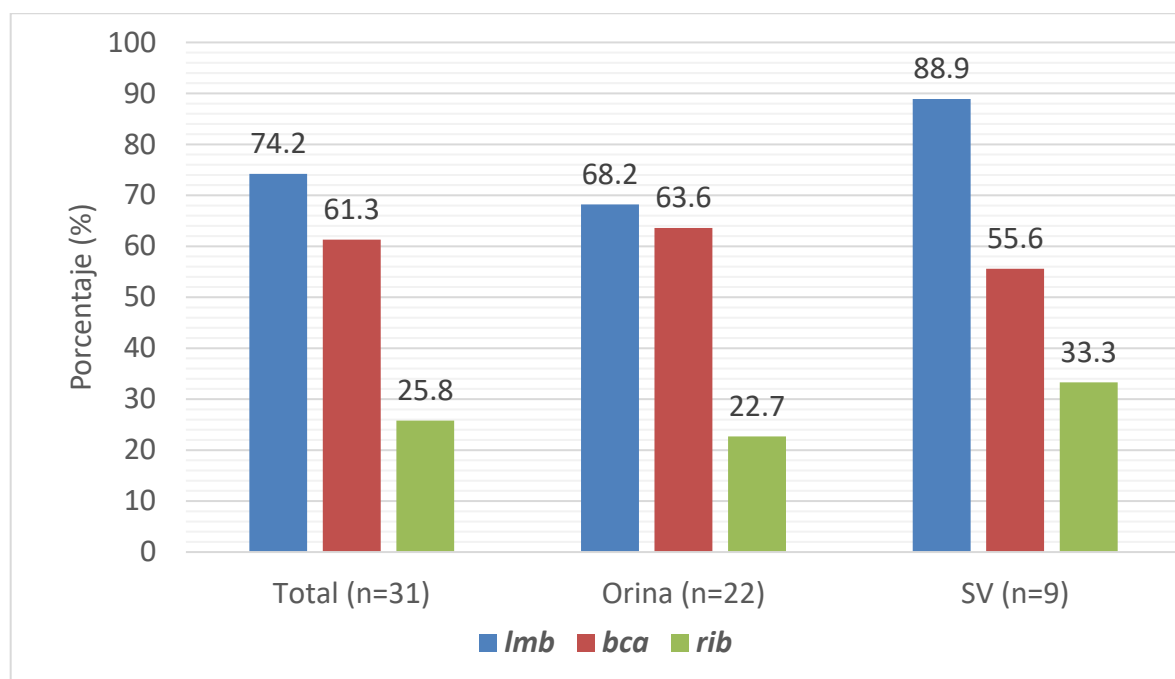


Ilustración 6. Frecuencia de los genes de virulencia por tipo de muestra en los aislados de EGB

Fuente: autoría propia

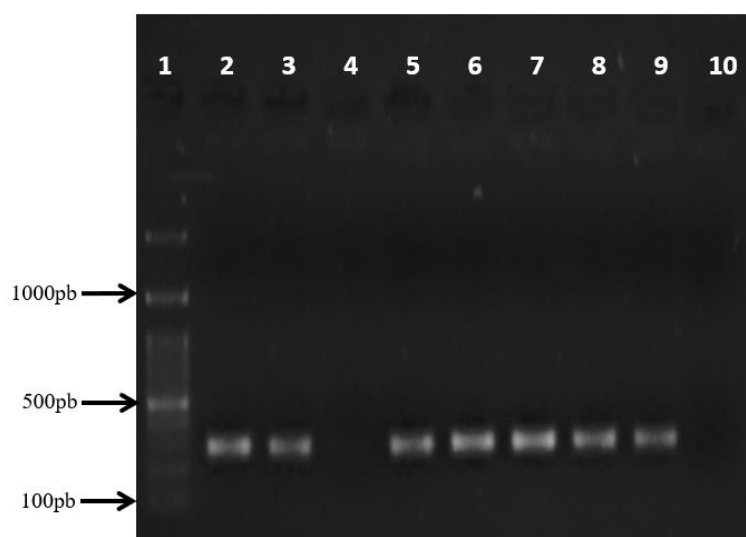


Ilustración 7. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *lmb* (300pb) en los aislados de EGB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 3, 5, 6, 7, 8 y 9: aislados positivos; carril 4: aislado negativo; carril 10: control negativo.

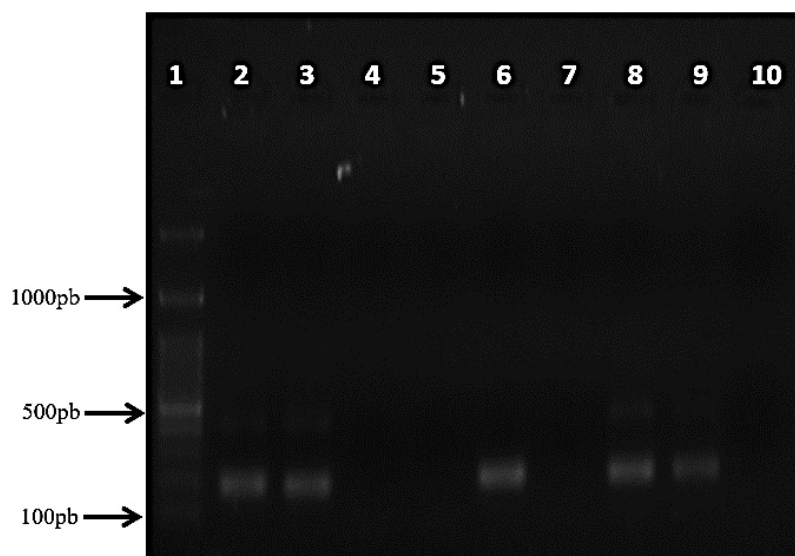


Ilustración 8. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *bca* (184pb) en los aislados de EGB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 3, 6, 8 y 9: aislados positivos; carril 4, 5 y 7: aislados negativos; carril 10: control negativo.

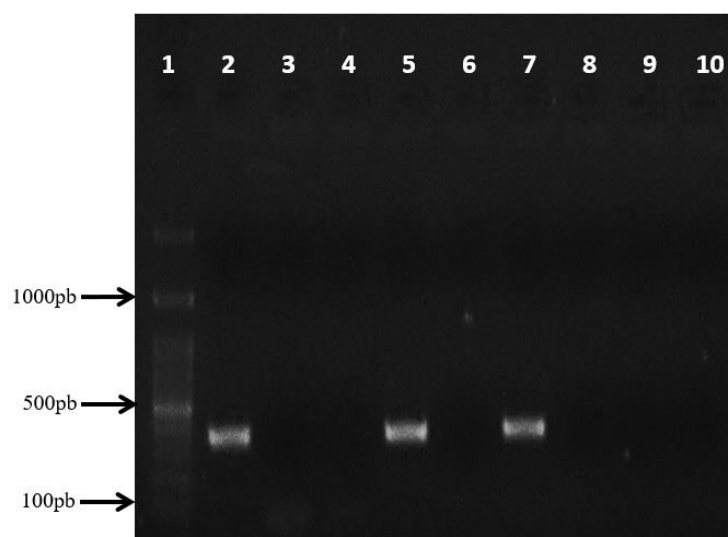


Ilustración 9. Gel de agarosa 1,5% de la corrida electroforética de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen *rib* (369pb) en los aislados de EGB. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; carril 2: control positivo; carril 5 y 7: aislados positivos; carril 3, 4, 6, 8 y 9: aislados negativos; carril 10: control negativo.

El perfil de susceptibilidad de los aislados de EGB mostró que 31/31 (100%) fueron sensibles a PE, AMP y VA, 15/31 (48,4%) resistentes a ERI, 17/31 (54,8%) resistentes a CLI y 6/31 (19,4%) resistente a LEV (Ilustración 10).

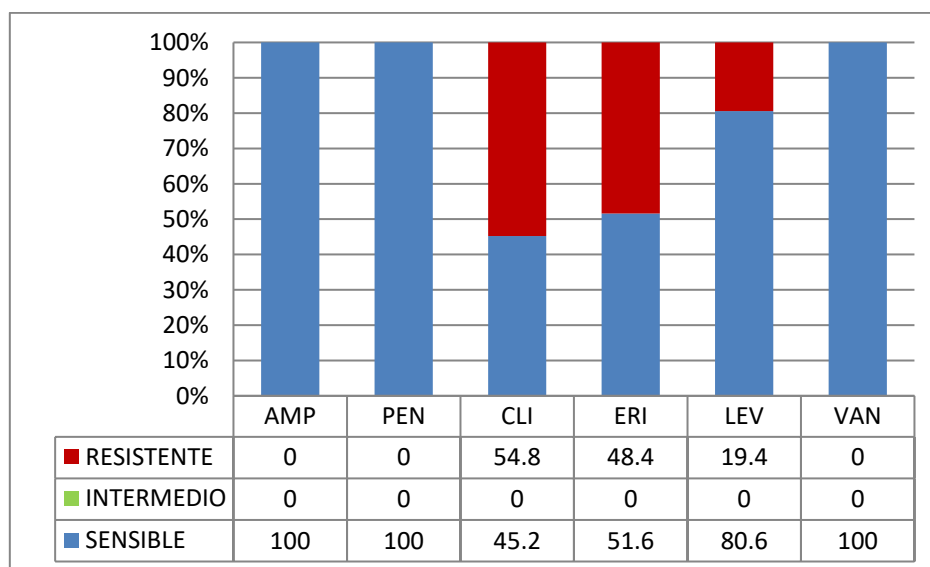


Ilustración 10. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en los aislados de EGB

AMP: ampicilina; PEN: penicilina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, LEV: levofloxacino y VAN: vancomicina.

V. DISCUSIÓN

Las infecciones invasivas por EGB y la consiguiente respuesta inflamatoria grave sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en los RN, en adultos gestantes y no gestantes; además, la reciente aparición de cepas de EGB resistentes a CLI y ERI representa una preocupación importante en el tratamiento de infecciones. Estas observaciones refuerzan la importancia del EGB como un problema de salud pública y la necesidad de estrategias terapéuticas y de prevención alternativas contra estas infecciones, esto se logrará con una mejor comprensión de los mecanismos de la patogénesis (79).

Con la finalidad de comprender la virulencia de los aislados, se analizaron algunos genes asociados con virulencia como *lmb*, *bca* y *rib*, y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana. En este estudio el gen de virulencia más frecuentemente detectado en los aislados fue el gen *lmb* en 74,2% (23/31). Y según el tipo de muestra, la frecuencia de este gen en aislados de muestras de orina fue de 68,2% (15/22) y en SV de 88,9% (8/9), siendo en este último el más frecuente; datos similares a lo reportado por Hanoun et al. (10) en Líbano en 2009 y Oviedo et al. (12) en Argentina en 2013, donde el gen *lmb* se halló en el 96% (73/76) y 94,3% (83/88) respectivamente de sus aislados de secreciones vaginales en mujeres gestantes. Al Safadi et al. (80) en Francia en 2010 detectó el gen en una frecuencia de 98,2% (109/111) en aislados invasivos y colonizantes de neonatos y gestantes. Udo et al. (81) en Kuwait en 2013 halló una frecuencia de 88,3% (136/154) en sus aislados de secreciones vaginales y orinas, en madres y recién nacidos. Dutra et al. (13) en Brasil en 2014 reportó una frecuencia de 100% (434/434) en las muestras tanto de pacientes colonizados (secreciones vaginal-rectal) como de adultos sintomáticos (orina). Eskandarian et al. (16) en Malasia en 2015 reportó en el 97,1% (100/103) de sus muestras: colonizantes, invasivas y no invasivas de recién nacidos, gestantes y adultos no gestantes. Wu et al. (82) en China en 2019 detectó el gen en una frecuencia de 94,9% (94/99) en aislados invasivos y colonizantes de neonatos y gestantes. Por otro lado, Laczeski et al. (14) en Argentina en 2014, informó la presencia del gen *lmb* en el 78,6% (11/14) de los aislados de muestras vaginal-rectal de mujeres gestantes, resultados similares a los nuestros; sin embargo, este no fue el gen más frecuente en su estudio. Y también esta misma autora Laczeski et al. (15) en Argentina en 2014, reporta una menor frecuencia del gen *lmb* en 54,5% (6/11) de aislados de hisopado vaginal-rectal e invasivos.

Como se observa en este trabajo y en estudios anteriores el gen *lmb* es detectado como uno de los genes de virulencia de mayor frecuencia en aislados clínicos de EGB, especialmente de SV, lo que sugiere que este factor es crucial para la colonización. Además, como se mencionó anteriormente este gen codifica la proteína de unión a laminina LMB, que permite al EGB colonizar el tracto genital inferior, adhiriéndose a las células epiteliales. Esa capacidad de unión a laminina en la membrana basal de los tejidos dañados puede ser un mecanismo clave que el EGB utiliza para diseminarse en el huésped humano (83).

En relación al gen *bca*, como también se mencionó codifica la proteína α -C que se asocia a la adherencia a las células epiteliales, se encontró en el 61,3% (19/31) de los aislados, y según el tipo de muestra, la frecuencia en aislados de muestras de orina fue de 63,6% (14/22) y en SV de 55,6% (5/9), a diferencia de lo reportado por Laczeski et al. (14) en Argentina en 2014, donde detectó el gen *bca* en el 100% (14/14) de sus aislados en secreciones vagino-rectal de mujeres gestantes. En 2013 Oviedo et al. (12) en Argentina lo reportó en el 88,6% (78/88) y Łysakowska et al. (84) en Polonia en 2011 en el 80% (32/40), de sus aislados de secreciones vagino-rectal de mujeres gestantes. Sin embargo, otros autores reportan una menor frecuencia de este gen *bca*, como es el caso de Manning et al. (9) en 2006 en Estados Unidos y Dutra et al. (13) en Brasil en 2014 en el 46% (155/338) y 49% (122/249) respectivamente de sus aislados colonizadores y en el 29% (47/162) y 36,2% (67/185) respectivamente de aislados causantes de infección. Persson et al. (85), en Suecia en 2008, lo detectó en el 14,5% (43/297) de aislados invasivos tanto de neonatos y adultos. Hanoun et al. (10) en Líbano en 2009 en el 56,6% (43/76) de sus aislados de muestras de SV. Udo et al. (81) en Kuwait en 2013 en el 57,8% (89/154), de muestras invasivas (59) y SV (95) de mujeres gestantes y recién nacidos. Eskandarian et al. (16) en Malasia en 2015 en el 14,6% (15/103) de aislados invasivos, no invasivos y colonizantes de pacientes ambulatorios y hospitalizados. Wu et al. (82) en China en 2019 en el 6% (6/99) de aislados invasivos y colonizantes provenientes de neonatos y gestantes. Jalalifar et al. (17) en Irán en 2019 reportó el gen *bca* en el 22% (22/100) de sus aislados de muestras de orina en pacientes con ITU.

La frecuencia del gen *rib* en nuestro trabajo, se encontró en 25,8% (8/31) de los aislados, y según el tipo de muestra, la frecuencia en aislados de muestras de orina fue de 22,7% (5/22) y en SV de 33,3% (3/9), similar a los resultados de Manning et al. (9) en Estados Unidos en 2006 quien reporta una frecuencia del gen en el 20% (68/338) de aislados colonizadores y en

el 28% (45/162) de aislados invasivos. Hannoun et al. (10) en Líbano en 2009 en 33% (25/76) de sus aislados de SV de mujeres gestantes. Eskandarian et al. (16) en Malasia en 2015 en 29,1% (30/103) de sus aislados invasivos, no invasivos y colonizantes de pacientes ambulatorios y hospitalizados. Y en menor frecuencia en relación a otras investigaciones que mostraron mayores porcentajes, como son los estudios de Persson et al. (85) en 2008 en Suecia con una frecuencia del gen *rib* en 43% (127/297) de aislados invasivos tanto de neonatos como de adultos. Keil et al. (11) en Argentina en 2010, evidenció la presencia del gen en el 87,8 % (36/41) de los aislados colonizantes de mujeres gestantes e invasivos de RN. Łysakowska et al. (84) en 2011 en Polonia en 44,4% (8/18) en los aislados de SV de mujeres gestantes. Oviedo et al. (12) en Argentina en 2013 en 76,1% (67/88) de muestras vaginal-rectal. Laczeski et al. (14,15) en Argentina con dos estudios en 2014 donde reportó 64,3% (9/14) de sus aislados vagino-rectal de mujeres gestantes y en 54,5% (6/11) de muestras vagino-rectal de gestantes y de aislados invasivos. Jalalifar et al. (17) en Irán en 2019 detectó el gen *rib* en el 40% (40/100) de sus aislados de muestras de orina en pacientes con ITU.

Estas diferencias de la frecuencia de los genes *bca* y *rib* podrían deberse a variaciones geográficas o diferencias temporales en la distribución de los serotipos capsulares de las cepas de EGB, como fuera ya descrito anteriormente (11, 12).

La prevalencia de los genes de virulencia estudiados en los aislados de EGB en este estudio fue alta. Además, se pudo detectar que el 67,7% (21/31) de los aislados presentaron más de un gen de virulencia, similar a lo reportado por Laczeski et al. (14) en Argentina en 2014 que en el 78,6% (11/14) de sus aislados detectaron más de un gen asociado a la virulencia. Sólo en dos de los aislados no se detectaron ningún gen de virulencia, porque probablemente los aislados evaluados pueden contener otros genes y factores de virulencia no evaluados en este estudio, ya que la virulencia del EGB es atribuible a múltiples genes. También es posible que estos genes de virulencia se expresen de manera diferente (o que puedan tener diferentes impactos en otras poblaciones susceptibles, por ejemplo, los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes). Es por eso que es necesario realizar más investigaciones sobre la prevalencia de genes de virulencia de EGB en todas las poblaciones tanto gestantes, neonatos, adultos no gestantes y adultos mayores, así como verificar la

diversidad de serotipos de esas cepas de EGB para obtener posiblemente datos completos sobre la patogenicidad de esas bacterias, y así poder complementar este estudio.

PE es el fármaco de elección en el tratamiento de la infección causada por EGB o para la PAI, el cual está incluido en las pautas de detección de EGB (86). Además, los aislados de EGB se caracterizan por ser sensible a PE (32), lo cual concuerda con estos resultados donde se obtuvo 100% de sensibilidad. Sin embargo, el problema surge en los casos, de pacientes alérgicos a PE, donde se administran comúnmente agentes antimicrobianos alternativos como CLI, ERI, VA (86), de los cuales las tasas de resistencia a ERI y CLI han ido en aumento (10). En cuanto al perfil de susceptibilidad frente a macrólidos y lincosamidas en EGB, nuestros resultados muestran que el 48,4% (15/31) y 54,8% (17/31) fueron resistentes a ERI y CLI, respectivamente. Estos porcentajes fueron más elevados que los observados en el estudio de Liébana-Martos et al. (32) en 2015 en el que reportan de 188 aislados una resistencia a ERI de 16,5% y a CLI de 10,1%. En investigaciones dentro de Latinoamérica se han descrito porcentajes de resistencia a ERI de 4,1% de 434 aislados (13), 8,9% de 671 (87), 11,6% de 112 aislados de EGB (12) y 21,43% de 14 aislados (14), este estudio presenta niveles más alto de resistencia a ERI. En cuanto a resistencias a CLI se han descrito porcentajes de 3% de 434 aislados (13), 2,4% de 671 (87) y 4% de 100 (88), estos porcentajes son claramente inferiores a los encontrados en este estudio.

Sin embargo, nuestros resultados se aproximan a los encontrados en el estudio de Back et al. (89) en 2012, donde se encontraron valores de 38,4% resistencia a CLI y 50,7% a ERI en 688 cultivos positivos para EGB; a los reportados por L. DiPersio y J. DiPersio (90) en 2006, en 200 aislados con tasas de 54% y 33% de resistencia a ERI y CLI respectivamente.

En el trabajo Jalalifar et al. (17) en 2019, determinaron en orinas procedentes de pacientes con infección del tracto urinario (100 aislados de EGB) resistencia a ERI (52%) y CLI (47%), datos similares a los obtenidos en este trabajo con 48,4% y 54,8% resistencia a ERI y CLI respectivamente, en las muestras de orina.

En Perú, los datos sobre la detección de genes de virulencia en EGB y los serotipos moleculares son inexistentes. Tenemos pocos estudios sobre la colonización de EGB y sus niveles de resistencia. Citamos a Tamariz et al. (6) en 2004, en su estudio informa una colonización de EGB del 10,9% y una resistencia de 11,5% a ERI. También la investigación de Rubio y Sánchez (7) en 2016, donde obtuvieron una colonización del 17% en gestantes.

Y en 2019 el estudio de Nauto, donde aisló EGB en el 23,1% de las 130 gestantes estudiadas (8). Recientemente, se ha descrito un incremento en los aislados de EGB en urocultivos, donde se observa un aumento del 1,6% en 2010 al 5,6% en 2018 (91).

Estos datos demuestran la importancia del conocimiento de los factores de virulencia, los serotipos y perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos frente a estos microorganismos en nuestro país, cuyo aislamiento se ha incrementado en los últimos años, tanto en gestantes como en pacientes adultos mayores y no gestantes. Son considerados importantes para la caracterización epidemiológica, los antígenos de proteínas de superficie y los genes que la codifican. La frecuencia de estas proteínas de virulencia varía según el origen de los aislados (colonizantes o invasivos), tiempo de investigación, área geográfica y población de estudio (12).

Si bien este estudio muestra la realidad de dos establecimientos de salud, estos resultados nos ayudarán a conocer la epidemiología local y nos alertan de la importancia de la detección de estos genes de virulencia en nuestro país.

VI. CONCLUSIONES

- El gen *lmb* fue detectado en el 74,2% (23/31) de los aislados de EGB, seguido de los genes *bca* y *rib* en 61,3% (19/31) y 25,8% (8/31) respectivamente. En el 67,7% (21/31) de los aislados se detectaron más de un gen de virulencia: 45,2% (14/31) positivos para genes *lmb-bca* y 22,6% (7/31) para *rib-lmb*.
- Los genes de virulencia *lmb* y *rib* se encontraron en mayor proporción en los aislados de las muestras de secreciones vaginales en comparación con los aislados de las muestras de orina; 88,9% (8/9) frente a 68,2% (15/22) y 33,3% (3/9) frente a 22,7% (5/22) respectivamente. A diferencia del gen *bca*, que fue mayor su frecuencia en los aislados de muestras de orina (63,6%; 14/22) que en los aislados de las muestras de secreciones vaginales (55,6%; 5/9).
- El 100% (31/31) de los aislados fueron susceptibles a PE y AMP, mientras que se observó altos niveles de resistencia a ERI en el 48,4% (15/31) de los aislados de EGB y a CLI en 54,8% (17/31).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 7° ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMWR Recomm Rep. 2010; 59 (RR-10):1-31.
3. Organización Mundial de la Salud. Reducir la mortalidad de los recién nacidos [Internet]. Ginebra: OMS; 2019 [citado 20 ene 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/newborns-reducing-mortality>.
4. Cometto MA, Gasparotto AM, Navarro M, et al. *Streptococcus agalactiae* en adultos no gestantes. Análisis de 10 años en un Hospital Universitario. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2018; 75(4):255-260. Published 2018 Dec 12. doi:10.31053/1853.0605.v75.n4.20569.
5. Abarzúa F, Arias A, García P, Ralph C, Cerda J, Riedel I, Gárate C. Aumento de resistencia de *Streptococcus agalactiae* vaginal-anal en el tercer trimestre de gestación a eritromicina y clindamicina al cabo de una década de tamizaje universal. Rev Chilena Infectol. 2011; 28(4): 334–337. Doi: 10.4067/S0716-10182011000500005.
6. Tamariz J, Obregon M, Jara J, Diaz J, Jefferson L, Guerra H. Colonización vaginal y anorectal por *Streptococcus agalactiae* en gestantes de los Hospitales Nacionales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza. Rev Med Hered. 2004; 15(3):144-150.
7. Rubio M, Sanchez G. Frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en secreción vaginal y zona ano-rectal en gestantes atendidas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, en el periodo de enero a mayo del 2016 [Tesis de pregrado]. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima; 2016.
8. Nauto-Ccorihuaman, E. *Streptococcus agalactiae* en gestantes de 35 a 37 semanas que acuden a control prenatal en el Instituto Nacional Materno Perinatal. Rev Peru Investig Matern Perinat. 2019; 8(4): 25-29. <https://doi.org/10.33421/inmp.2019170>.
9. Manning S, Ki M, Marrs C, Kugeler K, Borchardt S, Baker C, et al. The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among

- invasive and colonizing isolates. BMC Infect Dis. 2006; 6:116. doi:10.1186/1471-2334-6-116.
10. Hannoun A, Shehab M, Khairallah MT, Sabra A, Abi-Rached R, Bazi T, et al. Correlation between Group B Streptococcal Genotypes, Their Antimicrobial Resistance Profiles, and Virulence Genes among Pregnant Women in Lebanon. Int J Microbiol. 2009; 796512. doi: 10.1155/2009/796512.
 11. Keil A, Laczeski M, Oviedo P, Pegels E, Quiroga M, Fonseca M, et al. Detección del gen *rib* en cepas invasivas y colonizantes de *Streptococcus agalactiae* en Misiones. Rev Cienc Tecnol. 2010; 14: 25-28.
 12. Oviedo P, Pegels E, Laczeski M, Quiroga M, Vergara M. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina. Braz J Microbiol. 2013; 44(1):253- 258. doi: 10.1590/S1517-83822013005000030.
 13. Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect Dis. 2014; 14(1):323-330. doi:10.1186/1471-2334-14-323.
 14. Laczeski M, Novosak M, Quiroga M, Vergara M. Primer estudio molecular de *Streptococcus agalactiae* serotipo V en Misiones, Argentina. Enf Inf Microbiol. 2014; 34 (4): 132-139.
 15. Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. Molecular Profiles and Antimicrobial Susceptibility of First Isolates of *Streptococcus agalactiae* Serotype IX in Argentina. Adv in Microbiol. 2014; 4: 474-483.
 16. Eskandarian N, Ismail Z, Neela V, Van Belkum A, Desa M, Amin Nordin S. Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) from Malaysian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(3): 579–584.
 17. Jalalifar S, Havaei SA, Motallebirad T, Moghim S, Fazeli H, Esfahani BN. Determination of surface proteins profile, capsular genotyping, and antibiotic susceptibility patterns of Group B *Streptococcus* isolated from urinary tract infection

- of Iranian patients. BMC research notes. 2019; 12(1): 437. doi:10.1186/s13104-019-4428-4.
18. Wu B, Su J, Li L, et al. Phenotypic and genetic differences among group B *Streptococcus* recovered from neonates and pregnant women in Shenzhen, China: 8-year study. BMC Microbiol. 2019; 19: 185. doi:10.1186/s12866-019-1551-2.
 19. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25a ed. México DF: Mc Graw Hill Education; 2011.
 20. De La Rosa M, Prieto J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2003.
 21. Buxton R. Blood agar plates and hemolysis: *Streptococcus* and other catalase negative gram-positive cocci. [Internet]. American Society for Microbiology. 2005 [citado 2 junio 2020]. Disponible en: <https://www.asmscience.org/content/education/imagegallery/image.2881>.
 22. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
 23. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas: principios y Prácticas. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2006.
 24. Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B. Una historia de estreptococos neonatales del grupo B con sus tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas en los Estados Unidos. *J Pediatr Enfermera*. 2004; 19: 357–363.
 25. Edwards MS, Baker CJ. *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B). En Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Vol. 2. 8ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2016. p. 2467-75.
 26. Skoff TH, Farley MM, Petit S, et al. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(1):85-92. doi:10.1086/599369.
 27. Puertas-Prieto A, Lara-Oya A, Liébana Martos C, Rodríguez-Granger J, Cobo F, Sampedro A, et al. *Streptococcus agalactiae*: prevención y desarrollo de vacunas. *Rev Esp Quimioter*. 2017; 30(5): 312-318.
 28. Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1994; 22: 197-200.

29. MacFaddin, Jean F. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2° ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1980. p. 18-36.
30. Gunn BA. SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. J Clin Microbiol. 1976; 4: 192-193.
31. Paoletti LC, Kasper DL. Surface Structures of Group B *Streptococcus* Important in Human Immunity. Microbiol Spectr. 2019;7(2): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0001-2017. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0001-2017.
32. Liébana-Martos MC, Cabrera-Alavargonzalez J, Rodríguez-Granger J, Miranda-Casas C, Sampedro-Martínez A, Gutiérrez-Fernández J, et al. Serotipos y patrones de resistencia antibiótica en aislados beta hemolíticos de *Streptococcus agalactiae* de madres colonizadas y recién nacidos con enfermedad invasiva. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015; 33(2):84–88.
33. Di Bartolomeo S, Gentile M, Priore G, Valle S, Di Bella A. *Streptococcus agalactiae* en embarazadas. Prevalencia en el Hospital Nacional Alejandro Posadas. Rev Argent Microbiol. 2005; 37(3): 142–144.
34. Nitschke H, Slickers P, Müller E, Ehricht R, Monecke S. DNA microarray-based typing of *Streptococcus agalactiae* isolates. J Clin Microbiol. 2014; 52(11):3933–3943. doi:10.1128/JCM.02411-14.
35. García DA, Mojica ME, Méndez IA, Pachón DP, Prieto AC, Santamaría EV, et al. Prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en maternas usuarias del Hospital Militar Central. Bogotá, (Colombia) año 2010. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2011; 62(4):302-307.
36. Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(1):102-127.
37. Shabayek S, Spellerberg B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. Front Microbiol. 2018; 9:437. doi:10.3389/fmicb.2018.00437.
38. Nuccitelli A, Rinaudo CD, Maione D. Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art. Ther Adv Vaccines. 2015; 3(3):76–90. doi:10.1177/2051013615579869.

39. Laczeski M, Vergara M, Pegels E, Oviedo P, Novosak M, Soto P, et al. Estudios moleculares de cepas invasivas de *Streptococcus agalactiae* (SGB). SEM@FORO. 2014; 58: 78-79.
40. Li S, Jedrzejewski MJ. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. J Biol Chem. 2001; 276(44):41407-41416. Doi: 10.1074/jbc.M106634200
41. Cools P, Melin P. Group B *Streptococcus* and perinatal mortality. Res Microbiol. 2017; 168(9-10): 793–801.
42. Singh B, Fleury C, Jalalvand F, Riesbeck K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36: 1122–1180. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00340.x.
43. Landwehr-Kenzel S, Henneke P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. Front Immunol. 2014; 5:519. doi: 10.3389/fimmu.2014.00519.
44. Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, et al. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. Infect Immun. 2004; 72: 6197–6205. doi: 10.1128/iai.72.11.6197-6205.2004.
45. Gutekunst H, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The novel fibrinogenbinding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. Infect Immun. 2004; 72: 3495–3504. doi: 10.1128/iai.72.6.3495-3504.2004.
46. Seo HS, Mu R, Kim BJ, Doran KS, Sullam PM. Binding of glycoprotein Srr1 of *Streptococcus agalactiae* to fibrinogen promotes attachment to brain endothelium and the development of meningitis. PLoS Pathog. 2012; 8:e1002947. doi: 10.1371/journal.ppat.1002947.
47. Seo HS, Minasov G, Seepersaud R, Doran KS, Dubrovskaya I, Shuvalova L, et al. Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. J Biol Chem. 2013; 288: 35982–35996. doi: 10.1074/jbc.M113.513358.

48. Sheen TR, Jimenez A, Wang NY, Banerjee A, van Sorge NM, Doran KS. Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. J Bacteriol. 2011; 193: 6834–6842. doi:10.1128/jb.00094-11.
49. Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions. J Biol Chem. 2014; 289: 21003–21015. doi: 10.1074/jbc.M114.553073.
50. Mu R, Kim BJ, Paco C, Del Rosario Y, Courtney HS, Doran KS. Identification of a group B streptococcal fibronectin binding protein, SfbA, that contributes to invasion of brain endothelium and development of meningitis. Infect Immun. 2014; 82: 2276–2286. doi: 10.1128/iai.01559-13.
51. Brochet M, Couve E, Zouine M, Vallaey T, Rusniok C, Lamy MC, et al. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. Microbes Infect. 2006 ; 8 : 1227–1243. doi: 10.1016/j.micinf.2005.11.010.
52. Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Masignani V, Taddei A, et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood. Mol Microbiol. 2007; 63: 754–767. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05555.x.
53. Santi I, Maione D, Galeotti CL, Grandi G, Telford JL, Soriani M. BibA induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B Streptococcus. J Infect Dis. 2009; 200: 564–570. doi: 10.1086/60 3540.
54. Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. J Exp Med. 2010; 207: 2313–2322. doi: 10.1084/jem.20092594.
55. Palacios-Saucedo G, Hernández-Hernández TI, Rivera L, Briones E, Caballero-Trejo A, Vazquez-Guillen J, et al. Infección perinatal por estreptococo del grupo B: Panorama global, en América Latina y en México. Gac Med Mex. 2017; 361-70.
56. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid España. Justificación de una política de prevención de la enfermedad perinatal por estreptococo del grupo B (EGB). Recomendaciones. Enferm Infec Microbiol Clín. 1999; 17: 138-140.

57. Alfa MJ, Sepehri S, De Gagne P, Helawa M, Sandhu G, Harding GKM. Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol. 2010; 48(9): 3095–3099. Doi: 10.1128/JCM.00594-10.
58. Crespo-Ortiz MP, Henao-Giraldo EA, Espitia LM, Herrera-Jaramillo MH. Colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de los centros de atención de la ESE Norte en Cali. Ciencia&Salud. 2012; p1(2): 23-31.
59. Viracachá N, Barajas C, Báez M. Enfermedad neonatal temprana por *Streptococcus agalactiae* en una unidad de recién nacidos, factores de riesgo materno-fetales asociados a severidad y mortalidad. Rev Cienc Salud. 2011; 9(3): 39–46.
60. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Group B *Streptococcus* [Internet]. 2016 [citado 15 noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/abcs/reportsfindings/survreports/gbs16.pdf>.
61. Centers for Disease Control and Prevention. Estreptococo del grupo B. [Internet]. 2019 [citado 15 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/fast-facts-sp.html>.
62. Gosiewski T, Brzychczy-Wloch M, Heczko PB. The application of multiplex PCR to detect seven different DNA targets in group B streptococci. Folia Microbiol. 2012; 57(3): 163–167.
63. Villar HE, Jugo MB. Emergencia de *Streptococcus agalactiae* con resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomicina en Buenos Aires, Argentina. Rev Esp Quimioter. 2013; 26(2): 112–115.
64. Emaneini M, Mirsalehian A, Beigvierdi R, Fooladi A, Asadi F, Jabalameli F, et al. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus agalactiae* strains isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran. Maedica (Buchar). 2014; 9(2):157–161.
65. Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, Gertz Jr.RE, Schrag S, Nizet V, et al. Point mutation in the group B streptococcal pbp2x gene conferring decreased susceptibility to b-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 2915-8. doi: 10.1128/AAC.00461-08.

66. Campelo FA, Pedrosa AC, Antúnez IÁ, Capuz BL. Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002- 2010). *Rev Esp Quimioter*. 2012; 25(1):42-46.
67. Laczeski M, Pegels E, Oviedo P, Quiroga M, Vergara M. *Streptococcus agalactiae*, primer estudio en Misiones de genes de resistencia asociados a serotipos capsulares. *Rev Cienc Tecnol*. 2013; 20: 68-74.
68. Lin FY, Azimi PH, Weisman LE, Philips JB, Regan J, Clark P, et al. Antibiotic Susceptibility Profiles for Group B Streptococci Isolated from Neonates, 1995-1998. *Clin Infect Dis*. 2000; 31(1):76-9.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 35, M100-S29, 2019.
70. Famiglietti A, Quinteros M, Pedrari S, Corso A, Lopardo H, Marín M, et al. Actualización del consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos Gram positivos. *Rev Argent Microbiol*. 2004; 35: 29-40.
71. Tamariz Ortiz J, Cruz Quintanilla J, Atencia Porras A, Figueroa Tataje J, Horna Quintana G, Guerra Allison H. Resistencia a Clindamicina Inducida por Eritromicina en *Staphylococcus aureus* Aislados de Tres Hospitales de Lima, Perú. *Acta Med Peruana*. 2009; 26(1):12-16.
72. Portillo A, Lantero M, Zarazaga M, Gastañares MJ, Olarte I, Undabeitia E, et al. Resistencia a antibióticos macrólidos-lincosamidas-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de "*Streptococcus*" spp. en La Rioja. *Zubía. J Antimicrob Chemother*. 2001; 47: 115-116.
73. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(8): 541-553.
74. Mayers DL. Antimicrobial Drug Resistance. Cambridge, USA: Humana Press; 2009.
75. Arana DM, Rojo-Bezares B, Torres C, Alós JI. First clinical isolate in Europe of clindamycin-resistant group B *Streptococcus* mediated by the *lnu(B)* gene. *Rev Esp Quimioter*. 2014; 27(2): 106–9.

76. Okitsu N, Kaieda S, Yano H, Nakano R, Hosaka Y, Okamoto R, et al. Characterization of ermB Gene Transposition by Tn 1545 and Tn 917 in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 168–173. Doi: 10.1128/JCM.43.1.168.
77. Mazzanti M. Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Rev Colombiana de Bioética* [Internet]. 2011; 6 (1): 125-144. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189219032009>.
78. Adwan K. Fast DNA isolation and PCR protocols for detection of methicillin-resistant staphylococci. *Folia Microbiol.* 2014; 59: 5–8. Doi: 10.1007/s12223-013-0259-1.
79. Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* 2009; 4(2): 201–221. doi:10.2217/17460913.4.2.201.
80. Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, et al. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-lmb* intergenic region. *PLoS One.* 2010; 5(5):e10794. doi: 10.1371/journal.pone.0010794.
81. Udo EE1, Boswihi SS, Al-Sweih N. Genotypes and virulence genes in group B *Streptococcus* isolated in the maternity hospital, Kuwait. *Med Princ Pract.* 2013; 22(5):453-7. doi: 10.1159/000349932.
82. Wu B, Su J, Li L, et al. Phenotypic and genetic differences among group B *Streptococcus* recovered from neonates and pregnant women in Shenzhen, China: 8-year study. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 185. doi:10.1186/s12866-019-1551-2.
83. Armistead B, Oler E, Adams Waldorf K, Rajagopal L. The Double Life of Group B *Streptococcus*: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *J Mol Biol.* 2019; 431(16):2914-2931. doi:10.1016/j.jmb.2019.01.035.
84. Lysakowska ME, Kalinka J, Bigos M, Prosniewska M, Wasiela M. Occurrence of virulence genes among *S. agalactiae* isolates from vagina and anus of pregnant women—a pilot study. *Arch Perinat Med.* 2011; 17(4):229–234.

85. Persson E, Berg S, Bevanger L, Bergh K, Valsö-Lyng R, Trollfors B. Characterization of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 66-73.
86. Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797. *Obstet Gynecol*. 2020; 135(2): e51-e72. doi:10.1097/AOG.0000000000003668.
87. Crespo-Ortiz Mdel P, Castañeda-Ramirez CR, Recalde-Bolaños M, Vélez-Londoño JD. Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a Latin American hospital: a 17-year study. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:428. Published 2014 Aug 3. doi: 10.1186/1471-2334-14-428.
88. Martínez M, Ovalle A, Durán C, Reid I, Urriola G, Garay B, et al. Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae*. *Rev Med Chile*. 2004; 132(5): 549-555.
89. Back EE, O'Grady EJ, Back JD. High Rates of Perinatal Group B *Streptococcus* Clindamycin and Erythromycin Resistance in an Upstate New York Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (2): 739-742. doi: 10.1128/AAC.05794-11.
90. DiPersio LP, DiPersio JR. High Rates of Erythromycin and Clindamycin Resistance among OBGYN Isolates of Group B *Streptococcus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54: p 79-82.
91. Pulido A, Soto J. Incremento de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* en cultivos de orina en un hospital materno-infantil de Lima, Perú. *An Fac med* 2019; 80(2):266-7. doi: 10.15381/anales.802.16427.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR

I) DATOS MICROBIOLOGICOS DE *Streptococcus agalactiae*

1. Muestra clínica:

Urocultivo () Hemocultivo () Secreciones (): _____

Hisopado Rectal () otros: _____

2. Fecha de aislamiento e identificación: _____ Código _____

3. Método de identificación:

Manual () Sistema automatizado Vitek ()

4. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados en estudio:

Antibióticos	MIC	S	I	R
Ampicilina				
Penicilina				
Levofloxacino				
Eritromicina				
Clindamicina				
Vancomicina				

5. Fenotipo:

D-test Positivo () D-test Negativo ()

II) RESULTADO DE PRUEBA MOLECULAR:

Prueba PCR para genes	Resultado PCR (+/-)	Producto (pb)	Observaciones
<i>lmb</i>			
<i>rib</i>			
<i>bca</i>			

ANEXO 2

Consolidado de resultados

CÓDIGO DE MUESTRA	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)						GENES DE VIRULENCIA			TIPO DE MUESTRA
	AMP	PEN	CLI	ERY	LVX	VAN	rib	lmb	bca	
19A1423	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	-	-	ORINA
19A1433	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A1474	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	0.5	<=0,5	-	+	-	ORINA
19A2356*	<=0,25	<=0,12	<=0,25	>=8	>=8	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A2620	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A2664	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	-	+	ORINA
19A3027	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	2	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A3032	<=0,25	<=0,12	>=8	1	>=8	<=0,5	+	+	-	ORINA
19A3058	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	-	+	ORINA
19A3262	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	1	<=0,5	+	-	-	ORINA
19A3330	<=0,25	<=0,12	1	1	1	<=0,5	+	+	-	ORINA
19A3367	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A3474	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	1	<=0,5	-	-	+	ORINA
19A352	<=0,25	<=0,12	1	1	0.5	<=0,5	-	-	+	ORINA
19A3734	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	+	+	-	ORINA
19A3816	<=0,25	<=0,12	>=8	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A3830	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	>=8	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A3870	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	ORINA
19A3896	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	0.5	<=0,5	-	+	+	ORINA
C-01	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	1	<=0,5	-	-	+	SV
C-02	<=0,25	<=0,12	>=8	<=0,25	1	<=0,5	-	-	-	ORINA
C-03	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	>=8	<=0,5	+	+	-	ORINA
C-04	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	SV
C-05	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	1	<=0,5	+	+	-	SV
C-06	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	>=8	<=0,5	-	+	+	SV
C-07	<=0,25	<=0,12	<=0,25	1	1	<=0,5	-	+	+	SV
C-08	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	+	SV
C-09	<=0,25	<=0,12	>=8	<=0,25	1	<=0,5	+	+	-	SV
C-10	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	>=8	<=0,5	+	+	-	SV
C-11	<=0,25	<=0,12	<=0,25	<=0,25	1	<=0,5	-	+	-	SV
C-12	<=0,25	<=0,12	>=8	>=8	1	<=0,5	-	+	+	ORINA

^aCasillero verde: sensible; casillero rojo: resistente. ^bSV: Secreción vaginal. *Aislamiento D-test positivo [Fenotipo inducible iMLSB (Macrólidos, Lincosamidas, Streptograminas B)], informar como "resistentes a clindamicina" según recomendación del CLSI.

AMP: ampicilina; PEN: penicilina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, LEV: levofloxacino; VAN: vancomicina.